

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/54, C12P 17/18, C12N 9/10, 1/21 // (C12P 17/18, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19)	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/42591 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. August 1999 (26.08.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/01052 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Februar 1999 (17.02.99) (30) Prioritätsdaten: 198 06 872.7 19. Februar 1998 (19.02.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AK- TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHRÖDER, Hartwig [DE/DE]; Goethestrasse 5, D-69226 Nußloch (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, IL, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> <div style="text-align: center; font-size: 2em; font-family: cursive;">02 48792 020347</div>	
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING BIOTIN (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOTIN (57) Abstract <p>The invention relates to a genetic recombination product, containing an S-adenosyle-methionine-synthase gene, with the sequence SEQ ID no. 1 and a biotin biosynthesis gene bioS1, bioS2 and/or bioS3 with the sequences SEQ ID no. 3, SEQ ID no. 5 or SEQ ID no.7 and possibly at least one additional biotin synthesis gene sequence chosen from the group bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY or bioR. The invention also relates to organisms containing said genetic recombination product and to the use of same for producing biotin, as well as to a method for producing biotin.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Genkonstrukt, enthaltend ein S-Adenosyl-Methionin-Synthasegen, mit der Sequenz SEQ ID No. 1 und ein Biotin-Biosynthesegen bioS1, bioS2 und/oder bioS3 mit den Sequenzen SEQ ID No.3, SEQ ID No.5 bzw. SEQ ID No.7 und gegebenenfalls mindestens einer weiteren Biotinsynthesegensequenz ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR. Die Erfindung betrifft weiterhin Organismen, die dieses Genkonstrukt enthalten und die Verwendung des Genkonstrukts zur Herstellung von Biotin, sowie ein Verfahren zur Herstellung von Biotin.</p>		

UP

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Herstellung von Biotin

534 Rec'd PCT/PTO 16 AUG 2000

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Genkonstrukt, enthaltend ein S-Adenosyl-Methionin-Synthasegen, mit der Sequenz SEQ ID No. 1 und ein Biotin-Biosynthesegen bioS1, bioS2 und/oder bioS3 mit den Sequenzen SEQ ID No.3, SEQ ID No.5 bzw. SEQ ID No.7 und gegebenenfalls
10 mindestens einer weiteren Biotinsynthesegensequenz ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR. Die Erfindung betrifft weiterhin Organismen, die dieses Genkonstrukt enthalten und die Verwendung des Genkonstrukts zur Herstellung von Biotin, sowie ein Verfahren zur Her-
15 stellung von Biotin.

Als Coenzym spielt Biotin (Vitamin H) eine essentielle Rolle bei enzymkatalysierten Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen. Biotin ist damit ein essentieller Faktor in lebenden Zellen.
20 Biotin muß von fast allen Tieren und einigen Mikroorganismen von außen aufgenommen werden, da sie Biotin nicht selber synthetisieren können. Es ist damit für diese Organismen ein essentielles Vitamin. Bakterien, Hefen und Pflanzen hingegen können Biotin aus Vorstufen selbst synthetisieren (Brown et al. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 9, 1991: 295 - 326, DeMoll, E., Escherichia coli and Salmonella, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996: 704 - 708, ISBN 1-55581-084-5).
25

Die Biotinsynthese wurde in bakteriellen Organismen speziell im gramnegativen Bakterium Escherichia coli und im grampositiven Bakterium Bacillus sphaericus untersucht (Brown et al. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 9, 1991: 295 - 326). Als erstes bisher bekanntes Intermediat in E. coli wird Pimelyl-CoA (PmCoA) angesehen, das aus der Fettsäuresynthese stammt (DeMoll, E., Escherichia coli and Salmonella, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996: 704 - 708, ISBN 1-55581-084-5 1996).
30 Der Syntheseweg dieser Biotin-Vorstufe in E. coli ist bisher weitgehend unbekannt (Lemoine et al., Mol. Microbiol. 19, 1996: 645 - 647). Es wurden mit bioC und bioH zwei Gene identifiziert, deren korrespondierende Proteine für die Synthese von Pm-CoA verantwortlich sind. Die enzymatische Funktion der Genprodukte BioH und BioC ist bisher nicht bekannt (Lemoine et al., Mol. Microbiol. 19, 1996: 645 - 647, DeMoll, E., Escherichia coli and Salmonella, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996: 704 - 708, ISBN 1-55581-084-5). Pm-CoA wird in vier
35 weiteren enzymatischen Schritten zum Biotin umgewandelt. Ausgehend vom Pm-CoA findet zuerst die Kondensation mit Alanin zu
40

- 7-Keto-8-Amino-Pelargonsäure (KAPA) durch BioF statt. Es folgt die Umsetzung von KAPA zu 7,8 Diamino-Pelargonsäure (DAPA) durch BioA. Der nächste Schritt führt nach einer ATP-abhängigen Carboxylierungsreaktion zum Dethiobiotin (DTB) und wird durch BioD katalysiert. Im letzten Schritt findet die Umsetzung von DTB zu Biotin statt. Dieser Schritt wird durch BioB katalysiert. Der chemische und enzymatische Mechanismus der Umwandlung von DTB zu Biotin ist bisher nur unvollständig verstanden und aufgeklärt.
- 10 Eine Charakterisierung der Umwandlung von DTB zu Biotin wurde bisher ausschließlich in bakteriellen bzw. pflanzlichen Zellextrakten durchgeführt (WO94/8023, EP-B-0 449 724, Sanyal et al. Arch. Biochem. Biophys., Vol. 326, No. 1, 1996: 48 - 56 und Biochemistry 33, 1994: 3625 - 3631, Baldet et al. Europ. J. Biochem. 217, 1, 1993: 479 - 485, Méjean et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 217, No. 3, 1995: 1231 - 1237, Ohshiro et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 9, 1994: 1738 - 1741).

- In vitro Studien haben gezeigt, daß niedermolekulare Faktoren wie NADPH, Cystein, Thiamin, Fe^{2+} , Asparagin, Serin, Fruktose 1-6-bisphosphat und S-Adenosylmethionin die Synthese von Biotin stimulieren können (Ohshiro et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 9, 1994: 1738 - 1741, Birch et al., J. Biol. Chem. 270, 32, 1995: 19158 - 19165, Ifuku et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 2, 1995: 185 - 189, Sanyal et al. Arch. Biochem. Biophys. 326, 1, 1996: 48 - 56).

- Neben diesen niedermolekularen Faktoren wurden weitere Proteine identifiziert, die die Synthese von Biotin aus DTB in Gegenwart von BioB stimulieren. Dabei handelt es sich um Flavodoxin und Flavodoxin-NADPH-Reduktase (Birch et al., J. Biol. Chem. 270, 32, 1995: 19158 - 19165, Ifuk et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 2, 1995: 185 - 189, Sanyal et al., Arch. Biochem. Biophys. 326, 1, 1996: 48 - 56). Weitere Proteine, die eine Stimulation der Biotinsynthese bewirken, sind die in der deutschen Anmeldung mit der Anmelde Nummer 197.31274.8 (Priorität 22.7.97) beschriebenen Gene bioS1 und bioS2.

- Über die Herkunft des Schwefels im Biotinmolekül existieren unterschiedliche Ergebnisse. Bei Untersuchungen der Biotinsynthese in Gesamtzelextrakten wurde gezeigt, daß in Gegenwart von ^{35}S -markiertem Cystein Radioaktivität in Biotin inkorporiert wurde; weder mit ^{35}S -markiertem Methionin noch mit S-Adenosyl-Methionin konnte ein Schwefel-Einbau ins Biotinmolekül nachgewiesen werden (Ifuku et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 2, 1995: 184 - 189, Birch et al., J. Biol. Chem. 270, 32, 1995: 19158 - 19165).

Die für die beschriebenen Proteine kodierenden Gene bioF, bioA,

- bioD, und bioB sind in *E. coli* auf einem bidirektionalem Operon kodiert. Dieses Operon liegt zwischen der λ -attachement-site und dem *uvrB* Gen Locus bei ca. 17 Minuten auf dem *E. coli* Chromosom (Berlyn et al. 1996: 1715 - 1902). Auf diesem Operon sind zusätzlich noch zwei weitere Gene kodiert, von denen das eine, bioC, bereits beschriebene Funktionen in der Synthese von Pm-CoA hat, während einem offenen Leseraster hinter bioA bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte (WO94/8023, Otsuka et al., J. Biol. Chem. 263, 1988: 19577 - 85). Hoch konservierte Homologe zu den *E. coli* Proteinen BioF, A, D, B wurden in *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Syneccocystis* sp. (Brown et al. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 9, 1991: 295 - 326, Bower et al., J. Bacteriol. 175, 1996: 4122 - 4130, Kaneko et al., DNA Res. 3, 3, 1996: 109 - 136), Archaeobakterien wie *Methanococcus janaschi*, Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang et al., Arch. Biochem. Biophys. 309, 1, 1994: 29 - 35) oder in Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (Baldet et al., C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie. 319, 2, 1996: 99 - 106)) gefunden.
- 20 Die Synthese von Pm-CoA scheint in den beiden bisher untersuchten gram-positiven Mikroorganismen anders zu verlaufen als in *E. coli*. Es konnten keine Homologen von bioH und bioC gefunden werden (Brown et al. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 9, 1991: 295 - 326).
- 25 Biotin ist eine optisch aktive Substanz mit drei Chiralitätszentren. Es wird bisher wirtschaftlich nur über eine vielstufige, teure chemische Synthese hergestellt werden.
- 30 Alternativ zu dieser chemischen Synthese wurde eine Vielzahl von Versuchen unternommen, ein fermentatives Verfahren zur Herstellung von Biotin mit Mikroorganismen aufzubauen. Durch Klonierung des Biotin-Operons auf multi-copy-Plasmide konnte die Biotinsynthese in den mit diesen Genen transformierten Mikroorganismen erhöht werden. Eine weitere Erhöhung der Biotinsynthese wurde durch die Deregulierung der Biotingenexpression über die Selektion von birA-Mutanten erreicht (Pai C. H., J. Bacteriol. 112, 1972: 1280 - 1287). Die Kombination beider Ansätze, das heißt die Expression der Plasmid-kodierten Biosynthesegene in einem regulationsdefizienten Stamm (EP-B-0 236 429), brachte eine weitere Steigerung der Produktivität. Das Biotin-Operon kann dabei entweder unter Kontrolle seines nativen bidirektionalem Promotors verbleiben (EP-B-0 236 429), oder seine Gene können unter die Kontrolle eines extern regulierbaren Promotors gebracht werden (WO94/08023).
- 45 Durch die bisher verfolgten Ansätze zur fermentativen Herstellung von Biotin in *E. coli* konnte keine wirtschaftlich ausreichende

Produktivität erreicht werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein technisches, fermentatives Verfahren zur Herstellung von Biotin zu entwickeln,

5 daß eine möglichst hohe Biotinsynthese zeigt.

Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Biotin, dadurch gekennzeichnet, daß man ein S-Adenosyl-Methionin-Synthase(SAM-Synthase)-Gen mit der Sequenz SEQ ID
10 No. 1 und mindestens ein weiteres Biotin Biosynthesegen bioS1, bioS2 oder bioS3 mit den Sequenzen SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 und SEQ ID No.7 sowie ihre funktionellen Varianten, Analoge oder Derivate in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus, der in der Lage ist Biotin zu synthetisieren, exprimiert,
15 diesen züchtet und das synthetisierte Biotin direkt, nach Abtrennung der Biomasse oder nach Reinigung des Biotins verwendet, gelöst.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Gene, das SAM-Synthase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 und die Biotin-Biosynthesegene bioS1, bioS2 und bioS3 mit den Sequenzen SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 und SEQ ID No.7 werden in der SwissProt-Datenbank unter den "Accession"-Nummern P04384 (metK), U29581 (bioS1), P39171 (bioS2) und D90811 (bioS3) geführt. In der Datenbank sind
20 eine Reihe von Homologen zu MetK aus E. coli beschrieben. Diese Homologe umfassen Organismen wie weitere Eubakterien (z.B. H. influenza, B. subtilis), wie auch Eukaryonten (z.B. Hefen: S. cerevisiae, Planta: P. deltoides, Arthropoda D. melanogaster, und Mammalia: R. norvegicus).

30 Durch Expression einer oder mehrerer des SAM-Synthase-Gens mit der Sequenz SEQ ID No. 1, seiner funktionellen Varianten, Analoge oder Derivate in Kombination mit mindestens einem der Biotinsynthesegene bioS1, bioS2 oder bioS3 mit den Sequenzen SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 und SEQ ID No.7 sowie deren funktionelle Varianten,
35 Analoge oder Derivate in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus läßt sich die Produktivität der Biotinbiosynthese deutlich steigern. Bevorzugt wird eine Kombination von SAM-Synthase-Gen und bios1 zur Expression verwendet. Vorteilhafterweise wird für eine gesteigerte Biotinsynthese gleichzeitig
40 mindestens ein weiteres Biotingen ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR mit exprimiert. Durch die Expression der Gene wird die Synthese von Biotin um mindestens den Faktor 2 gegenüber der Kontrolle ohne diese Gene, bevorzugt um einen Faktor größer 3, gesteigert.

45

Nach Isolierung und Sequenzierung sind die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Gene, das SAM-Synthase-Gen mit der Nukleotidsequenz SEQ ID No. 1, das bioS1 Gen mit der Nukleotidsequenz SEQ ID No. 3, das bioS2 Gen mit der Nukleotidsequenz SEQ ID No. 5 und das bioS3 Gen mit der Nukleotidsequenz SEQ ID No. 7 erhältlich, die für die in SEQ ID NO: 2, respektive SEQ ID No. 4, respektive SEQ ID No. 6 und SEQ ID No. 8 angegebenen Aminosäuresequenzen oder deren Allelvariationen kodieren. Unter Varianten sind SEQ ID No. 1-, SEQ ID No. 3- bzw. SEQ ID No. 5, respektive SEQ ID No. 7-Varianten zu verstehen, die 30 bis 100 % Homologie auf Aminosäureebene, bevorzugt 50 bis 100 %, ganz besonders bevorzugt 80 bis 100 % aufweisen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 und SEQ ID No. 7 dargestellten Sequenzen erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität aber erhalten bleibt.

Weiterhin sind unter Varianten auch funktionelle Äquivalente der Gene wie die O-Acetyl-serinsulfhydrolyase A, die O-Acetyl-serinsulfhydrolyase B, die β -Cystathionase (siehe Flint et al., J. Biol. Chem., Vol. 271, 1996: 16053 - 16067) oder nifs und seine prokaryontischen und eukaryontischen Homologen beispielsweise aus Klebsiella, Candida, Hefen oder aus Caenorhabditis zu verstehen, die in der Lage sind die enzymatische Aktivität von bioS1, bioS2 oder bioS3 in der Biotinsynthese zu übernehmen.

Unter funktionellen Analogen von SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 und SEQ ID No. 7 sind beispielsweise ihre prokaryontischen oder eukaryontischen Homologen wie bakterielle, pilzliche, pflanzliche, tierische oder menschliche Homologen zu verstehen. Unter Analogen sind weiterhin auch verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

Derivate sind beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Die Promotoren, die den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschaltet sind, können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt wird. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

Unter Derivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -30 vor dem Startkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression

erhöht wird. Vorteilhafterweise geschieht dies durch eine veränderte Shine-Dalgarno-Sequenz.

Als prokaryontische Wirtsorganismen des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen prinzipiell alle Biotin synthetisierenden gram-negativen oder gram-positiven Bakterien in Frage. Als gram-negative Bakterien seien beispielhaft Enterobacteriaceae wie die Gattungen *Escherichia*, *Aerobacter*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia* oder *Salmonella*, *Pseudomonadaceae* wie die Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Glucobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Methanomonas*, *Comamonas*, *Cellulomonas* oder *Acetobacter*, *Azotobacteraceae* wie die Gattungen *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia* oder *Derxia*, *Neisseriaceae* wie die Gattungen *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Kingella*, *Neisseria* oder *Branhamella*, die *Rhizobiaceae* wie die Gattungen *Rhizobium* oder *Agrobacterium* oder die gram-negativen Gattungen *Zymomonas*, *Chromobacterium* oder *Flavobacterium*, genannt. Als gram-positive Bakterien seien beispielhaft die Endosporen-bildenden gram-positiven aeroben oder anaeroben Bakterien wie die Gattungen *Bacillus*, *Sporolactobacillus* oder *Clostridium*, die coryneformen Bakterien wie die Gattungen *Arthrobacter*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium* oder *Kurtzia*, die *Actinomycetales* wie die Gattungen *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* oder *Nocardia*, die *Lactobacillaceae* wie die Gattungen *Lactobacillus* oder *Lactococcus*, die gram-positiven Kokken wie die Gattungen *Micrococcus* oder *Staphylococcus*, genannt.

Bevorzugt werden Bakterien der Gattungen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Chromobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* oder *Staphylococcus* im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet. Besonders bevorzugt werden Gattungen und Arten wie *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mutabilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Comamonas acidovorans*, *Comamonas testosteroni*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Azotobacter vinelandii*, *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter paraffineus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium primorioxydans*, *Corynebacterium* sp., *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium* sp., *Streptomyces lividans*, *Rhizobium leguminosarum* oder *Agrobacterium tumefaciens*. Vorteilhafterweise werden Bakterien verwendet, die schon eine erhöhte natürliche Biotinproduk-

tion besitzen.

Die taxonomische Stellung der aufgeführten Gattungen unterlag in den letzten Jahren einem starken Wandel und befindet sich noch
5 immer im Fluß, da falsche Gattungs- und Artnamen korrigiert werden. Aufgrund dieser in der Vergangenheit häufig erforderlichen taxonomischen Umgruppierungen der genannten Gattungen innerhalb der bakteriellen Systematik sind auch andere als die oben genannten Familien, Gattungen und Arten für das erfindungsgemäße Ver-
10 fahren geeignet.

Als eukaryontische Wirtsorganismen des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen prinzipiell alle Biotin synthetisierenden Organismen in Frage wie Pilze, Hefen, Pflanzen oder pflanzliche Zellen. Als
15 Hefen seien die Gattungen *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Sporobolomyces*, *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces* bevorzugt genannt. Besonders bevorzugt sind die Gattungen und Arten *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Yarrowia lipolytica*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces shibatanus* oder *Sac-*
20 *charomyces cerevisiae*.

Als Wirtsorganismus können prinzipiell alle Pflanzen verwendet werden, bevorzugt werden Pflanzen, die in der Tierernährung oder in der humanen Ernährung eine Rolle spielen wie Mais, Weizen,
25 Gerste, Roggen, Kartoffeln, Erbsen, Bohnen, Sonnenblumen, Palmen, Hirse, Sesam, Kopra oder Raps. Auch Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Lavendula vera* sind geeignet. Besonders bevorzugt werden pflanzliche Zellkulturen, Protoplasten aus Pflanzen oder Kaluskulturen.

30

Vorteilhafterweise werden im erfindungsgemäßen Verfahren Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Hefen oder pflanzliche Zellen verwendet, die in der Lage sind Biotin in das Anzuchtmedium auszuscheiden und die gegebenenfalls zusätzlich schon eine erhöhte natürliche Biotinsynthese haben. Vorteilhafterweise können diese
35 Organismen noch bezüglich der Regulation ihrer Biotinbiosynthese defekt sein, das heißt es findet keine oder nur eine sehr verringerte Regulation der Synthese statt. Dieser Regulationsdefekt hat zur Folge, daß diese Organismen schon eine wesentlich höhere Biotinproduktivität besitzen. Ein solcher Regulationsdefekt ist beispielsweise von *Escherichia coli* als *birA*-Defektmutanten bekannt
40 und sollte vorzugsweise in Form eines durch äußere Einflüsse induzierbaren Defektes, beispielsweise temperaturinduzierbar, in den Zellen vorhanden sein. Es können im Prinzip auch Organismen
45 verwendet werden, die keine natürliche Biotinproduktion aufweisen, nachdem sie mit den Biotingenen transformiert wurden.

Um die Biotinproduktivität insgesamt weiter zu steigern sollten die Organismen im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhafterweise zusätzlich mindestens ein weiteres Biotingen ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR enthalten. Vorteilhafterweise können auch solche Gene in Kombination mit der Sequenz SEQ ID No. 1, der SEQ ID NO: 3, der SEQ ID No.5 oder der SEQ ID NO.7 und ihrer Kombinationen in der Zelle vorhanden sein, die die Biotinsynthese stimulieren. Gene die die Biotinsynthese stimulieren sind z. B. das Flavore-

5 oder bioR enthalten. Vorteilhafterweise können auch solche Gene in Kombination mit der Sequenz SEQ ID No. 1, der SEQ ID NO: 3, der SEQ ID No.5 oder der SEQ ID NO.7 und ihrer Kombinationen in der Zelle vorhanden sein, die die Biotinsynthese stimulieren. Gene die die Biotinsynthese stimulieren sind z. B. das Flavore-

10 doxin-Gen, die Flavoredoxin-Reduktase-Gen. Dieses zusätzliche Gen oder diese zusätzlichen Gene können wie auch die Gene mit der Sequenz SEQ ID No. 1, der SEQ ID NO.3, SEQ ID No.5 oder der SEQ ID NO.7 oder deren Kombinationen in ein oder mehreren Kopien in der Zelle vorhanden sein. Sie können auf dem gleichen Vektor wie die

15 Sequenz SEQ ID No. 1, SEQ ID NO.3, SEQ ID No.5 und/oder SEQ ID No.7 lokalisiert sein oder auf getrennten Vektoren oder aber chromosomal integriert worden sein. Auch die Sequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID No.3, SEQ ID No.5 und/oder SEQ ID No.7 können zusammen auf einem Vektor oder auf getrennten Vektoren sein oder

20 ins Genom inseriert werden.

Unter dem erfindungsgemäßen Genkonstrukt sind die Gensequenzen des SAM-Synthase-Gens SEQ ID No. 1 und der Biotinsynthegene SEQ ID No.3, SEQ ID No.5 und/oder SEQ ID No.7, sowie deren funktionelle Varianten, Analoge oder Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No.5 und/oder SEQ ID No.7 inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation

25 nelle Varianten, Analoge oder Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No.5 und/oder SEQ ID No.7 inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation

30 wird nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation durch Biotin mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Die Sequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID No.3, SEQ ID No.5 und/oder SEQ ID No.7 können unter der Regulation eines Promotors oder unter der Regulation getrennter Promotoren liegen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte regulatorische Elemente inseriert werden. Die Gene mit den Sequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No.5 oder SEQ ID No. 7 können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

35

40

45

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-,

tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI^q-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ -P_R- oder im λ -P_L-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefepromotoren ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten.

10 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

15 Im Genkonstrukt können weitere Biotingene ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR in einer oder mehreren Kopien enthalten sein, die einen eigenen Promotor haben können oder aber unter der Regulation des Promotors einer der Sequenzen oder unter der Regulation des Pro-
20 motors der gesamten Sequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No.5 oder SEQ ID No.7 liegen können.

Das Genkonstrukt wird zur Expression in den oben genannten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor
25 inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle
30 anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

35 Unter Expressionssysteme sind die Kombination aus den oben beispielhaft genannten Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren wie Plasmide, Viren oder Phagen wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter System, die Phagen λ , Mu oder andere temperänte Phagen oder Transposons und/oder wei-
40 teren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen zu verstehen.

Bevorzugt sind unter dem Begriff Expressionssysteme die Kombination aus Escherichia coli und seinen Plasmiden und Phagen und den dazugehörigen Promotoren sowie Bacillus und seine Plasmide und
45 Promotoren zu verstehen.

Für die vorteilhafte erfindungsgemäße Expression der SEQ ID No.1, SEQ ID No.3, SEQ ID No.5 und/oder SEQ ID No. 7 sind außerdem weitere 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen geeignet.

- 5 Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Biotingene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

10

- Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Biotingenexpression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem 15 starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

20

Unter "Enhancer" sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte Biotingenexpression bewirken.

- 25 Eine Steigerung der von der Sequenz SEQ ID No. 1, SEQ ID No.3, SEQ ID No.5 und SEQ ID No.7 abgeleiteten Proteinen (siehe SEQ ID No.2, SEQ ID No.4, SEQ ID No.6 und SEQ ID No.8) und ihrer Enzymaktivität läßt sich zum Beispiel gegenüber den Ausgangsenzymen durch Veränderung der entsprechenden Gensequenzen oder der Sequenzen seiner Homologen durch klassische Mutagenese wie UV-Be- 30 strahlung oder Behandlung mit chemischen Mutagentien und/oder durch gezielte Mutagenese wie site directed mutagenesis, Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) erzielen. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität neben der beschriebenen Genamplifikation durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzybiosynthese reprimieren und/oder durch Synthese aktiver statt inaktiver Enzyme erreicht werden. 35

- 40 Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird die Umwandlung von DTB in Biotin und damit die Biotinproduktivität insgesamt über die in die Organismen über Vektoren und/oder chromosomal klonierten eingebrachten Biotingene mit der Sequenz SEQ ID No. 1, der SEQ ID No.3, SEQ ID No.5 und der SEQ ID No.7 und der Kombinationen der Gene der Sequenz SEQ ID No.1 und der SEQ ID No.5 oder SEQ ID No.1 45 und der SEQ ID No.7, bevorzugterweise die Kombination der Gene der Sequenz SEQ ID No.1 und der SEQ ID No.3 vorteilhaft gesteigert.

gert.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die SEQ ID No.1, SEQ ID No.3, SEQ ID No.5 und/oder SEQ ID No.7 enthaltenen Mikroorganismen in einem Medium, das das Wachstum dieser Organismen ermöglicht, angezüchtet. Dieses Medium kann ein synthetisches oder ein natürliches Medium sein. Je nach Organismus werden dem Fachmann bekannte Medien verwendet. Für das Wachstum der Mikroorganismen enthalten die verwendeten Medien eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle, anorganische Salze und gegebenenfalls geringe Mengen an Vitamine und Spurenelemente.

Vorteilhafte Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Zucker wie Mono-, Di- oder Polysaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, Xylose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose, komplexe Zuckerquellen wie Melasse, Zuckerphosphate wie Fructose-1,6-bisphosphat, Zuckeralkohole wie Mannit, Polyole wie Glycerin, Alkohole wie Methanol oder Ethanol, Carbonsäuren wie Citronensäure, Milchsäure oder Essigsäure, Fette wie Sojaöl oder Rapsöl, Aminosäuren wie Glutaminsäure oder Asparaginsäure oder Aminosucker, die auch gleichzeitig als Stickstoffquelle verwendet werden können.

Vorteilhafte Stickstoffquellen sind organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispiele sind Ammoniumsalze wie NH_4Cl oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Nitrate, Harnstoff, oder komplexe Stickstoffquellen wie Maisquellwasser, Bierhefeautolysat, Sojabohnenmehl, Weizengluten, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Caseinhydrolysat, Hefe oder Kartoffelprotein, die häufig auch gleichzeitig als Stickstoffquelle dienen können.

Beispiele für anorganische Salze sind die Salze von Calcium, Magnesium, Natrium, Mangan, Kalium, Zink, Kupfer und Eisen. Als Anion dieser Salze sind besonders das Chlor-, Sulfat- und Phosphation zu nennen. Ein wichtiger Faktor zur Steigerung der Produktivität im erfindungsgemäßen Verfahren ist der Zusatz von Fe^{2+} - oder Fe^{3+} -Salzen und/oder Kaliumsalzen zum Produktionsmedium.

40 Gegebenenfalls werden dem Nährmedium weitere Wachstumsfaktoren zugesetzt, wie beispielsweise Vitamine oder Wachstumsförderer wie Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nicotinsäure, Pantothenat oder Pyridoxin, Aminosäuren wie Alanin, Cystein, Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin, Serin, Methionin oder Lysin, Carbonsäuren wie Citronensäure, Ameisensäure, Pimelinsäure oder Milchsäure, oder Substanzen wie Dithiothreitol.

Zur Stabilisierung der Vektoren mit den Biotingenen in den Zellen können gegebenenfalls Antibiotika dem Medium zugesetzt werden.

Das Mischungsverhältnis der genannten Nährstoffe hängt von der
5 Art der Fermentation ab und wird im Einzelfall festgelegt. Die Mediumkomponenten können alle zu Beginn der Fermentation vorgelegt werden, nachdem sie falls erforderlich getrennt sterilisiert oder gemeinsam sterilisiert wurden, oder aber je nach Bedarf während der Fermentation nachgegeben werden.

10

Die Züchtungsbedingungen werden so festgelegt, daß die Organismen optimal wachsen und daß die bestmöglichen Ausbeuten erreicht werden. Bevorzugte Züchtungstemperaturen liegen bei 15 °C bis 40 °C. Besonders vorteilhaft sind Temperaturen zwischen 25 °C und 37 °C.

15 Vorzugsweise wird der pH-Wert in einem Bereich von 3 bis 9 festgehalten. Besonders vorteilhaft sind pH-Werte zwischen 5 und 8. Im allgemeinen ist eine Inkubationsdauer von 8 bis 240 Stunden bevorzugt von 8 bis 120 Stunden ausreichend. Innerhalb dieser Zeit reichert sich die maximale Menge an Biotin im Medium an und/oder
20 ist nach Aufschluß der Zellen verfügbar.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Biotin kann kontinuierlich oder batch- oder fed-batch-weise durchgeführt werden. Werden aus den mit den Biotingenen transformierten Pflanzen-
25 zellen ganze Pflanzen regeneriert, so können diese nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ganz normal angezüchtet und vermehrt werden.

Beispiele:
30

1. Klonierung des S-Adenosyl-Methionin-Synthase-Gens
(SEQ ID No.1):

35 Das Gen, das für SAM-Synthase (metK) kodiert, wurde aus dem Chromosom von E. coli durch eine Polymerase-Kettenreaktion mit Hilfe zweier spezifischer Oligonukleotide ausgehend von genomischer E. coli DNA amplifiziert. Die derart amplifizierte DNA wurde aufgereinigt, mit dem Restriktionsenzym Acc65I verdaut und in einen
40 mit dem gleichen Enzym geschnittenen Vektor inseriert, der eine Überexpression des Gens in E. coli Stämmen ermöglicht. Durch eines der beiden Oligonukleotide wurde das Genkonstrukt mit oti- mierten Translationssignalen versehen

45 a.) Entwicklung von Oligonukleotiden zur Amplifizierung des metK Gens aus dem E. coli Chromosom:

metK soll als Expressionskassette bestehend aus einer ribosomalen Bindungsstelle, dem Startkodon der kodierenden Sequenz und dem Stopkodon zwischen zwei Erkennungstellen für Restriktionsenzyme amplifiziert werden. Für beide Restriktionsschnittstellen wurde
5 die Erkennungssequenz von Acc65I gewählt. Das metK Gen wurde mit Hilfe der Oligonucleotide PmetK1 (5'- GCGGTACCAGGTGATATTAAATATG-GCAAAAC-3') und PmetK2 (5'-CGGGTACCGATTACTTCAGACCGGCAGC-3') amplifiziert und kloniert.

10 b.) Durchführung der PCR:

Bedingungen:

15 Als Matrize wurden 0,5 µg chromosomale DNA von E. coli W3110 verwendet. Die Oligonukleotide PmetK1 und PmetK2 wurden in einer Konzentration von je 15 pMol eingesetzt. Die Konzentration an dNTP's betrug 200 µM. Als Polymerase wurden 2,5 U Pwo DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) im Reaktionspuffer des Herstellers eingesetzt. Das Volumen der PCR-Reaktion betrug 100 µl.

20

Amplifikationsbedingungen:

Die Denaturierung der DNA erfolgte für 2 min bei 94 °C. Anschließend wurden die Oligonukleotide für 30 sec bei 55 °C angelagert.
25 Die Elongation erfolgte für 75 sec bei 72 °C. Die PCR-Reaktion wurde über 30 Zyklen durchgeführt.

Das erhaltene DNA-Produkt mit einer Größe von ca. 1145 bp wurde
30 aufgereinigt und durch Acc65I im geeigneten Puffer verdaut.

c.) Klonierung von metK in Expressionsvektor

2 µg des Vektors pHS1 (Konstruktion wurde in DE 197.31274.8, Priorität 22.7.97, Beispiele 1. Seite 14 bis 17 beschrieben) wurden
35 durch Acc65I verdaut und durch Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) (Boehringer Mannheim) dephosphoryliert. Nach Denaturierung der SAP wurden Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 durch den Rapid-DNA-Ligation Kit nach der Vorschrift des Herstellers ligiert. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte
40 in den Stamm E. coli XL-1-blue. Positive Klone wurden durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse identifiziert. Die richtige Orientierung des MetK-Fragments in pHS1 wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung bestimmt. Das erhaltene Konstrukt wurde pHS1 metK (Figur 1) genannt. Die Sequenz von pHS1
45 metK ist SEQ ID No.9 zu entnehmen. SEQ ID No.10 zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz der codierenden Region für metK.

2. Konstruktion der Plasmide pHBbio14 und pHS1 bioS1

Die Konstruktion der Plasmide pHBbio14 und pHS1 bioS1 wurde bereits beschrieben (DE 197.31274.8, Priorität 22.7.97, Beispiele 1, 2 und 5).

3. Konstruktion von pHS1 metK bioS1

Die Plasmide pHS1 bioS1 [SEQ ID No.11, (DE 197.31274.8, Priorität 22.7.97), SEQ ID No.12 zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz der codierenden Region für bioS1] und pHS1 metK SEQ ID No.9 wurden durch einen Plasmid-Präparationsmethode (Boehringer) aufgereinigt. Aus pHS1 metK wurde das metK-Gen tragende Fragment durch einen Acc65I-Verdau isoliert. pHS1 bioS1 wurde durch Acc65I verdaut, und durch Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) (Boehringer Mannheim) dephosphoryliert. Nach Denaturierung der SAP nach Vorschrift des Herstellers wurden Vektor und das metK Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 durch den Rapid-DNA-Ligation Kit nach der Vorschrift des Herstellers ligiert. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte in den Stamm E. coli XL-1-blue. Positive Klone wurden durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse identifiziert. Die richtige Orientierung des metK-Fragments in pHS1 bioS1 wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung bestimmt. Das erhaltene Konstrukt wurde pHS1 metK bioS1 (Figur 2) genannt. Die Sequenz von pHS1 metK bioS1 ist SEQ ID No.13 zu entnehmen. SEQ ID No.14 zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz der codierenden Region für metK, SEQ ID No.15 zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz der codierenden Region für bioS1

4. Erhöhung der Biotin-Produktivität durch Überexpression von metK, bioS1 und metK in Kombination mit bioS1.

Vom Stamm BM4086 (Ketner und Campbell J. Molec. Biology 1975 96:13) wurde durch Plattieren auf Rifampycin-Platten spontan-Rifampycin-resistente Kolonien isoliert. Von einem dieser resistenten Stämme wurde ein Pl-Lysat erzeugt. Mit diesem Pl-Lysat wurde der Stamm W3110 transduziert und anschließend Klone durch Rifampycin selektioniert. Der erhaltene Stamm mit dem Plasmid pHBbio14 nach der CaCl₂-Methode transformiert (Maniatis et al. Molecular Cloning Cols Spring Harbour Laboratory Press 1989) und auf LB-Ampizillin 100 µg/ml angezogen. Der isolierte transformierte Stamm (LU5560), wurde jeweils mit dem Plasmiden pHS1, pHS1 metK, pHS1 bioS1 oder pHS1 metK bioS1 nach der CaCl₂-Methode transformiert und auf LB-Agar mit Ampizillin 100 µg/ml und Kanamycin 25 µg/ml selektioniert.

Je eine Kolonie der jeweiligen Transformanden wurde in einer DYT-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotika angeimpft und für 12 h inkubiert. Die Übernachtskultur (= ÜNK) wurde eingesetzt um eine 10 ml Kultur in TB-Medium (Sambrook, J. Fritsch, E F. Maniatis, T.

5 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989

ISBN 0-87969-373-8), das 30g/l Glycerol enthält, mit den entsprechenden Antibiotika anzuimpfen. Im Fall der Gegenwart der Plasmide pHS1, pHS1 metK, pHS1bioS1 und pHS1 metK bioS1 erfolgte gleichzeitig der Zusatz von 1mM IPTG und 0,5% Arabinose zur Induktion der Genexpression von metK und bioS1 bzw. der Kombination beider Gene. Nach 24h Stunden wurden die Zellen vom Kulturüberstand durch Zentrifugation abgetrennt und die Biotin-Konzentration durch einen kompetitiven ELISA mit Streptavidin im Überstand bestimmt. Die Ergebnisse dieser Bestimmung sind Tabelle I zu entnehmen.

Tabelle I: Bestimmung der Biotinkonzentration

Stamm	Plasmid I	Plasmid II	Biotin mg/l
20 LU5580	pHBbio14	Kontrolle, ohne Plasmid	11
LU5580	pHBbio14	pHS1	25
LU5580	pHBbio14	pHS1 bioS1	45
LU5580	pHBbio14	pHS1 metK	37
25 LU5580	pHBbio14	pHS1 metK bioS1	52

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Biotin, dadurch gekennzeichnet,
5 daß man ein S-Adenosyl-Methionin-Synthasegen mit der Sequenz
SEQ ID No. 1 und mindestens ein weiteres Biotin-Biosynthese-
gen bioS1, bioS2 oder bioS3 mit den Sequenzen SEQ ID No. 3,
SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 7 sowie ihre funktionellen Va-
rianten, Analoge oder Derivate in einem prokaryontischen oder
10 eukaryontischen Wirtsorganismus, der in der Lage ist Biotin
zu synthetisieren, exprimiert, diesen züchtet und das synthe-
tisierte Biotin direkt, nach Abtrennung der Biomasse oder
nach Reinigung des Biotins verwendet.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es
sich bei den Varianten der Gene mit den Sequenzen SEQ ID
No.1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 und SEQ ID No. 7 um Gene
handelt, die auf der von den Sequenzen nach Anspruch 1 abge-
leiteten Aminosäureebene eine Homologie von 30 bis 100 % auf-
20 weisen und eine gesteigerte Biotinsynthese ermöglichen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß
als Wirtsorganismus ein Organismus ausgewählt aus der Gruppe
25 der Gattungen Escherichia, Citrobacter, Serratia, Klebsiella,
Salmonella, Pseudomonas, Comamonas, Acinetobacter, Azotobac-
ter, Chromobacterium, Bacillus, Clostridium, Arthrobacter,
Corynebacterium, Brevibacterium, Lactococcus, Lactobacillus,
Streptomyces, Rhizobium, Agrobacterium, Staphylococcus, Rho-
dotorula, Sporobolomyces, Yarrowia, Schizosaccharomyces oder
30 Saccharomyces verwendet wird.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeich-
net, daß als Wirtsorganismus eine regulationsdefekte Biotin-
mutante verwendet wird.
- 35 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeich-
net, daß die Expression mindestens einer Kopie der Gene mit
den Sequenzen SEQ ID No.1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 und SEQ
ID No. 7 nach Anspruch 1 allein oder mit einer oder mehreren
40 Kopien mindestens eines weiteren Biotingens ausgewählt aus
der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW,
bioX, bioY oder bioR in einem prokaryontischen oder eukaryon-
tischen Wirtsorganismus erfolgt.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression mindestens einer Kopie der Gene mit den Sequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 und SEQ ID No. 7 nach Anspruch 1 allein oder mit einer oder mehreren Kopien mindestens eines weiteren Biotingens ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus auf einem gemeinsamen oder auf getrennten Vektoren erfolgt.
7. Genkonstrukt enthaltend ein S-Adenosyl-Methionin-Synthasegen mit der SEQ ID No. 1 und mindestens ein weiteres Biotin-Biosynthesegen bioS1, bioS2 oder bioS3 mit den Sequenzen SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 und SEQ ID No. 7 sowie ihre funktionellen Varianten, Analoge oder Derivate, das mit einem oder mehreren Regulationssignalen zur Erhöhung der Genexpression und/oder Proteinexpression funktionell verknüpft ist und/oder dessen natürliche Regulation ausgeschaltet wurde.
8. Genkonstrukt nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es in einem Vektor inseriert wurde, der für die Expression des Gens in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus geeignet ist.
9. Genkonstukt nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene mit den Sequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 und SEQ ID No. 7 sowie ihre funktionellen Varianten, Analoge oder Derivate in mehreren Kopien im Genkonstrukt vorliegen.
10. Genkonstrukt nach Ansprüchen 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das S-Adenosyl-Methionin-Synthasegen SEQ ID No. 1 und mindestens ein weiteres Biotin-Biosynthesegen bioS1, bioS2 oder bioS3 mit den Sequenzen SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 und SEQ ID No. 7 sowie ihre funktionellen Varianten, Analoge oder Derivate nach Anspruch 7 zusammen mit einer oder mehreren Kopien mindestens eines weiteren Gens ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR im Genkonstrukt oder Vektor vorliegt.
11. Organismen enthaltend ein Genkonstrukt gemäß den Ansprüchen 7 bis 10.
12. Verwendung der Sequenzen gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Biotin.

13. Verwendung des bioS3-Gens mit der Sequenz SEQ ID No. 7 seiner funktionellen Varianten, Analoge oder Derivate allein oder in Kombination mit mindestens einem weiteren Gen ausgewählt aus der Gruppe S-Adenosyl-Methionin-Synthasegen, bioS1, bioS2, bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR zur Herstellung von Biotin.
14. Verwendung eines Genkonstrukts gemäß den Ansprüchen 7 bis 10 zur Herstellung von Biotin.

10

15

20

25

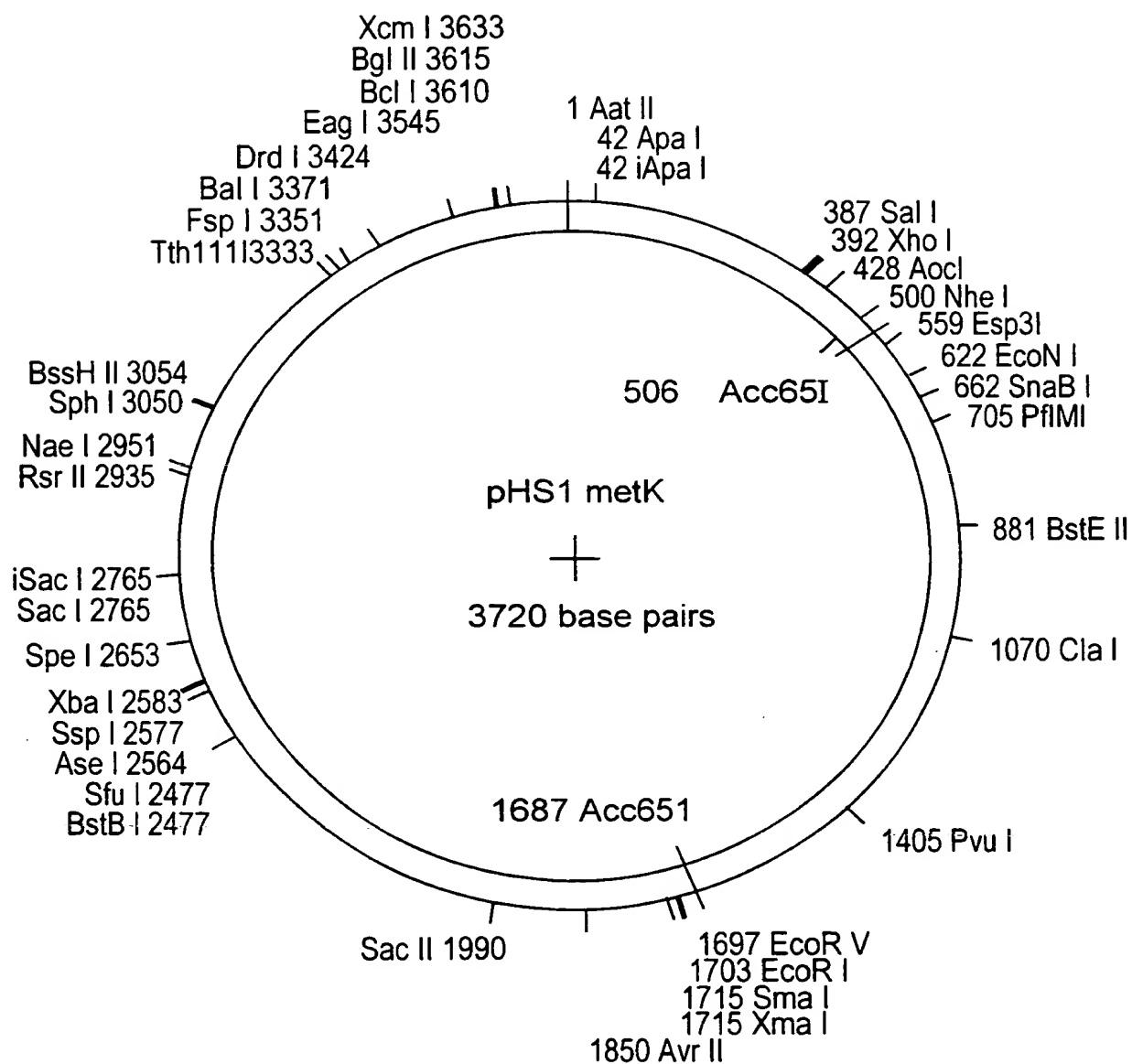
30

35

40

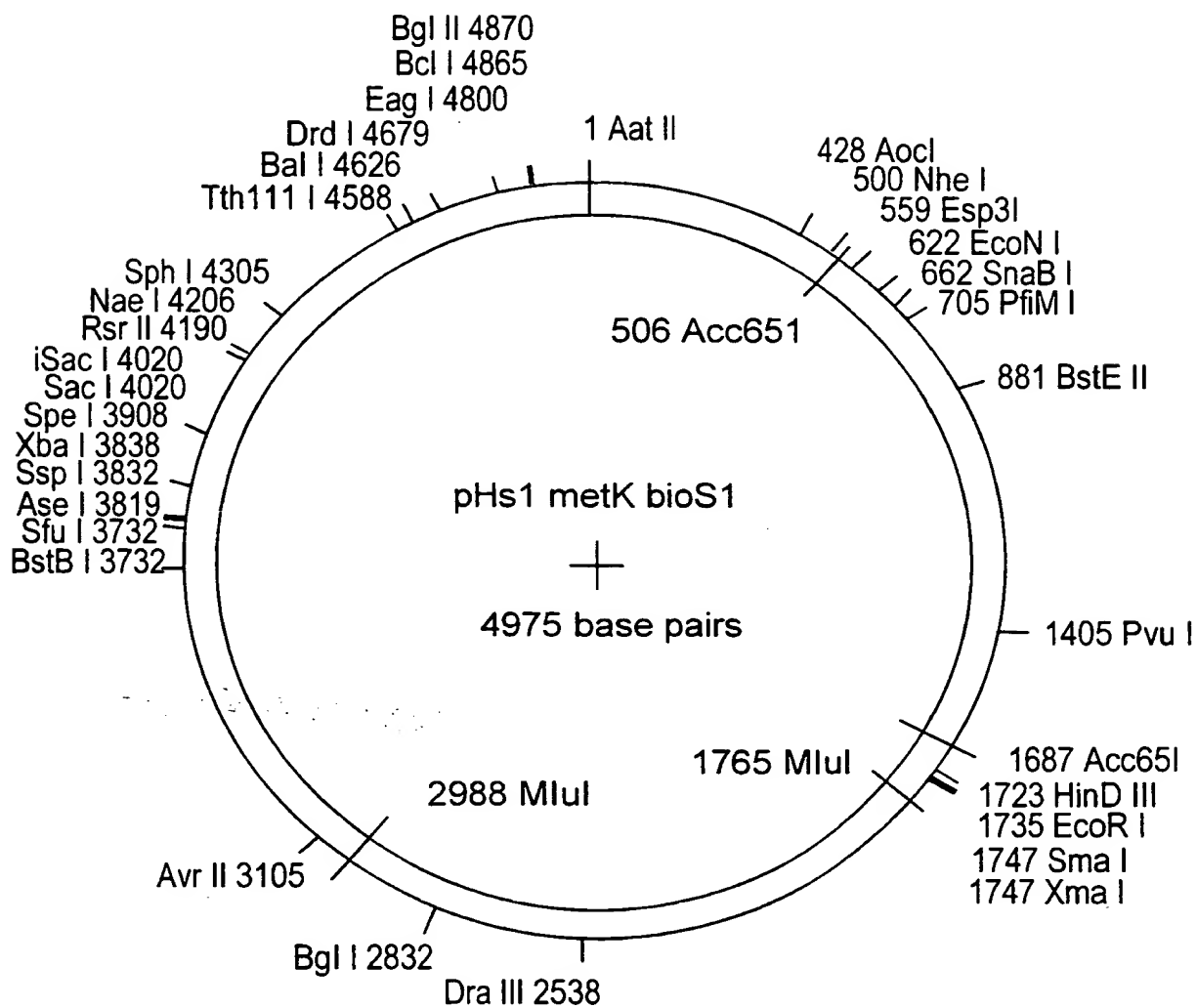
45

FIG.1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG.2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Verfahren zur Herstellung von Biotin

<130> 0050_48792

<140> 19806872.7

<141> 1998-02-19

<160> 15

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1155

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1155)

<400> 1

atg gca aaa cac ctt ttt acg tcc gag tcc gtc tct gaa ggg cat cct	48
Met Ala Lys His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro	
1 5 10 15	

gac aaa att gct gac caa att tct gat gcc gtt tta gac gcg atc ctc	96
Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu	
20 25 30	

gaa cag gat ccg aaa gca cgc gtt gct tgc gaa acc tac gta aaa acc	144
Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr	
35 40 45	

ggc atg gtt tta gtt ggc ggc gaa atc acc acc agc gcc tgg gta gac	192
Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp	
50 55 60	

atc gaa gag atc acc cgt aac acc gtt cgc gaa att ggc tat gtg cat	240
Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His	
65 70 75 80	

tcc gac atg ggc ttt gac gct aac tcc tgt gcg gtt ctg agc gct atc	288
Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile	
85 90 95	

ggc aaa cag tct cct gac atc aac cag ggc gtt gac cgt gcc gat ccg	336
Gly Lys Gln Ser Pro Asp Ile Asn Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp Pro	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

100	105	110	
ctg gaa cag ggc gcg ggt gac cag ggt ctg atg ttt ggc tac gca act			384
Leu Glu Gln Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr			
115	120	125	
aat gaa acc gac gtg ctg atg cca gca cct atc acc tat gca cac cgt			432
Asn Glu Thr Asp Val Leu Met Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His Arg			
130	135	140	
ctg gta cag cgt cag gct gaa gtg cgt aaa aac ggc act ctg ccg tgg			480
Leu Val Gln Arg Gln Ala Glu Val Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro Trp			
145	150	155	160
ctg cgc ccg gac gcg aaa agc cag gtg act ttt cag tat gac gac ggc			528
Leu Arg Pro Asp Ala Lys Ser Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp Asp Gly			
165	170	175	
aaa atc gtt ggt atc gat gct gtc gtg ctt tcc act cag cac tct gaa			576
Lys Ile Val Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu			
180	185	190	
gag atc gac cag aaa tcg ctg caa gaa gcg gta atg gaa gag atc atc			624
Glu Ile Asp Gln Lys Ser Leu Gln Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile			
195	200	205	
aag cca att ctg ccc gct gaa tgg ctg act tct gcc acc aaa ttc ttc			672
Lys Pro Ile Leu Pro Ala Glu Trp Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe Phe			
210	215	220	
atc aac ccg acc ggt cgt ttc gtt atc ggt ggc cca atg ggt gac tgc			720
Ile Asn Pro Thr Gly Arg Phe Val Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys			
225	230	235	240
ggt ctg act ggt cgt aaa att atc gtt gat acc tac ggc ggc atg gcg			768
Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala			
245	250	255	
cgt cac ggt ggc ggt gca ttc tct ggt aaa gat cca tca aaa gtg gac			816
Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val Asp			
260	265	270	
cgt tcc gca gcc tac gca gca cgt tat gtc gcg aaa aac atc gtt gct			864
Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala			
275	280	285	
gct ggc ctg gcc gat cgt tgt gaa att cag gtt tcc tac gca atc ggc			912
Ala Gly Leu Ala Asp Arg Cys Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile Gly			
290	295	300	
gtg gct gaa ccg acc tcc atc atg gta gaa act ttc ggt act gag aaa			960

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Val Ala Glu Pro Thr Ser Ile Met Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys
 305 310 315 320

gtg cct tct gaa caa ctg acc ctg ctg gta cgt gag ttc ttc gac ctg 1008
 Val Pro Ser Glu Gln Leu Thr Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe Asp Leu
 325 330 335

cgc cca tac ggt ctg att cag atg ctg gat ctg ctg cac ccg atc tac 1056
 Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Gln Met Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr
 340 345 350

aaa gaa acc gca gca tac ggt cac ttt ggt cgt gaa cat ttc ccg tgg 1104
 Lys Glu Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu His Phe Pro Trp
 355 360 365

gaa aaa acc gac aaa gcg cag ctg ctg cgc gat gct gcc ggt ctg aag 1152
 Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys
 370 375 380

taa 1155

385

<210> 2

<211> 384

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Ala Lys His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro
 1 5 10 15

Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu
 20 25 30

Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr
 35 40 45

Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp
 50 55 60

Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His
 65 70 75 80

Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile
 85 90 95

Gly Lys Gln Ser Pro Asp Ile Asn Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp Pro
 100 105 110

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Leu Glu Gln Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr
 115 120 125

Asn Glu Thr Asp Val Leu Met Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His Arg
 130 135 140

Leu Val Gln Arg Gln Ala Glu Val Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro Trp
 145 150 155 160

Leu Arg Pro Asp Ala Lys Ser Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp Asp Gly
 165 170 175

Lys Ile Val Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu
 180 185 190

Glu Ile Asp Gln Lys Ser Leu Gln Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile
 195 200 205

Lys Pro Ile Leu Pro Ala Glu Trp Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe Phe
 210 215 220

Ile Asn Pro Thr Gly Arg Phe Val Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys
 225 230 235 240

Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala
 245 250 255

Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val Asp
 260 265 270

Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala
 275 280 285

Ala Gly Leu Ala Asp Arg Cys Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile Gly
 290 295 300

Val Ala Glu Pro Thr Ser Ile Met Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys
 305 310 315 320

Val Pro Ser Glu Gln Leu Thr Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe Asp Leu
 325 330 335

Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Gln Met Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr
 340 345 350

Lys Glu Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu His Phe Pro Trp
 355 360 365

Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys
 370 375 380

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 3
 <211> 1206
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1206)

<400> 3
 atg aac gtt ttt aat ccc gcg cag ttt cgc gcc cag ttt ccc gca cta 48
 Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu
 1 5 10 15

cag gat gcg ggc gtc tat ctc gac agc gcc gcg acc gcg ctt aaa cct 96
 Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro
 20 25 30

gaa gcc gtg gtt gaa gcc acc caa cag ttt tac agt ctg agc gcc gga 144
 Glu Ala Val Val Glu Ala Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly
 35 40 45

aac gtc cat cgc agc cag ttt gcc gaa gcc caa cgc ctg acc gcg cgt 192
 Asn Val His Arg Ser Gln Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg
 50 55 60

tat gaa gct gca cga gag aaa gtg gcg caa tta ctg aat gca ccg gat 240
 Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp
 65 70 75 80

gat aaa act atc gtc tgg acg cgc gcc acc act gaa tcc atc aac atg 288
 Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met
 85 90 95

gtg gca caa tgc tat gcg cgt ccg cgt ctg caa ccg gcc gat gag att 336
 Val Ala Gln Cys Tyr Ala Arg Pro Arg Leu Gln Pro Gly Asp Glu Ile
 100 105 110

att gtc agc gtg gca gaa cac cac gcc aac ctc gtc ccc tgg ctg atg 384
 Ile Val Ser Val Ala Glu His His Ala Asn Leu Val Pro Trp Leu Met
 115 120 125

gtc gcc caa caa act gga gcc aaa gtg gtg aaa ttg ccg ctt aat gcg 432
 Val Ala Gln Gln Thr Gly Ala Lys Val Val Lys Leu Pro Leu Asn Ala
 130 135 140

cag cga ctg ccg gat gtc gat ttg ttg cca gaa ctg att act ccc cgt 480
 Gln Arg Leu Pro Asp Val Asp Leu Leu Pro Glu Leu Ile Thr Pro Arg
 145 150 155 160

THIS PAGE BLANK (USPTO)

agt cgg att ctg gcg ttg ggt cag atg tgc aac gtt act ggc ggt tgc	528
Ser Arg Ile Leu Ala Leu Gly Gln Met Ser Asn Val Thr Gly Gly Cys	
165 170 175	
ccg gat ctg gcg cga gcg att acc ttt gct cat tca gcc ggg atg gtg	576
Pro Asp Leu Ala Arg Ala Ile Thr Phe Ala His Ser Ala Gly Met Val	
180 185 190	
gtg atg gtt gat ggt gct cag ggg gca gtg cat ttc ccc gcg gat gtt	624
Val Met Val Asp Gly Ala Gln Gly Ala Val His Phe Pro Ala Asp Val	
195 200 205	
cag caa ctg gat att gat ttc tat gct ttt tca ggt cac aaa ctg tat	672
Gln Gln Leu Asp Ile Asp Phe Tyr Ala Phe Ser Gly His Lys Leu Tyr	
210 215 220	
ggc ccg aca ggt atc ggc gtg ctg tat ggt aaa tca gaa ctg ctg gag	720
Gly Pro Thr Gly Ile Gly Val Leu Tyr Gly Lys Ser Glu Leu Leu Glu	
225 230 235 240	
gcg atg tgc ccc tgg ctg ggc ggc ggc aaa atg gtt cac gaa gtg agt	768
Ala Met Ser Pro Trp Leu Gly Gly Gly Lys Met Val His Glu Val Ser	
245 250 255	
ttt gac ggc ttc acg act caa tct gcg ccg tgg aaa ctg gaa gct gga	816
Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu Glu Ala Gly	
260 265 270	
acg cca aat gtc gct ggt gtc ata gga tta agc gcg gcg ctg gaa tgg	864
Thr Pro Asn Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala Leu Glu Trp	
275 280 285	
ctg gca gat tac gat atc aac cag gcc gaa agc tgg agc cgt agc tta	912
Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser Arg Ser Leu	
290 295 300	
gca acg ctg gcg gaa gat gcg ctg gcg aaa cgt ccc ggc ttt cgt tca	960
Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser	
305 310 315 320	
ttc cgc tgc cag gat tcc agc ctg ctg gcc ttt gat ttt gct ggc gtt	1008
Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val	
325 330 335	
cat cat agc gat atg gtg acg ctg ctg gcg gag tac ggt att gcc ctg	1056
His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu	
340 345 350	
cgg gcc ggg cag cat tgc gct cag ccg cta ctg gca gaa tta ggc gta	1104
Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val	
355 360 365	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

acc ggc aca ctg cgc gcc tct ttt gcg cca tat aat aca aag agt gat 1152
 Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp
 370 375 380

gtg gat gcg ctg gtg aat gcc gtt gac cgc gcg ctg gaa tta ttg gtg 1200
 Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val
 385 390 395 400

gat taa 1206
 Asp

<210> 4

<211> 401

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro
 20 25 30

Glu Ala Val Val Glu Ala Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly
 35 40 45

Asn Val His Arg Ser Gln Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg
 50 55 60

Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met
 85 90 95

Val Ala Gln Cys Tyr Ala Arg Pro Arg Leu Gln Pro Gly Asp Glu Ile
 100 105 110

Ile Val Ser Val Ala Glu His His Ala Asn Leu Val Pro Trp Leu Met
 115 120 125

Val Ala Gln Gln Thr Gly Ala Lys Val Val Lys Leu Pro Leu Asn Ala
 130 135 140

Gln Arg Leu Pro Asp Val Asp Leu Leu Pro Glu Leu Ile Thr Pro Arg
 145 150 155 160

Ser Arg Ile Leu Ala Leu Gly Gln Met Ser Asn Val Thr Gly Gly Cys
 165 170 175

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Pro Asp Leu Ala Arg Ala Ile Thr Phe Ala His Ser Ala Gly Met Val
 180 185 190
 Val Met Val Asp Gly Ala Gln Gly Ala Val His Phe Pro Ala Asp Val
 195 200 205
 Gln Gln Leu Asp Ile Asp Phe Tyr Ala Phe Ser Gly His Lys Leu Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Thr Gly Ile Gly Val Leu Tyr Gly Lys Ser Glu Leu Leu Glu
 225 230 235 240
 Ala Met Ser Pro Trp Leu Gly Gly Gly Lys Met Val His Glu Val Ser
 245 250 255
 Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu Glu Ala Gly
 260 265 270
 Thr Pro Asn Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala Leu Glu Trp
 275 280 285
 Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser Arg Ser Leu
 290 295 300
 Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser
 305 310 315 320
 Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val
 325 330 335
 His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu
 340 345 350
 Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val
 355 360 365
 Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp
 370 375 380
 Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val
 385 390 395 400

Asp

<210> 5

<211> 1215

<212> DNA

<213> Escherichia coli

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1215)

<400> 5

atg aaa tta ccg att tat ctc gac tac tcc gca acc acg ccg gtg gac	48
Met Lys Leu Pro Ile Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala Thr Thr Pro Val Asp	
1 5 10 15	
ccg cgt gtt gcc gag aaa atg atg cag ttt atg acg atg gac gga acc	96
Pro Arg Val Ala Glu Lys Met Met Gln Phe Met Thr Met Asp Gly Thr	
20 25 30	
ttt ggt aac ccg gcc tcc cgt tct cac cgt ttc ggc tgg cag gct gaa	144
Phe Gly Asn Pro Ala Ser Arg Ser His Arg Phe Gly Trp Gln Ala Glu	
35 40 45	
gaa gcg gta gat atc gcc cgt aat cag att gcc gat ctg gtc ggc gct	192
Glu Ala Val Asp Ile Ala Arg Asn Gln Ile Ala Asp Leu Val Gly Ala	
50 55 60	
gat ccg cgt gaa atc gtc ttt acc tct ggt gca acc gaa tct gac aac	240
Asp Pro Arg Glu Ile Val Phe Thr Ser Gly Ala Thr Glu Ser Asp Asn	
65 70 75 80	
ctg gcg atc aaa ggt gca gcc aac ttt tat cag aaa aaa ggc aag cac	288
Leu Ala Ile Lys Gly Ala Ala Asn Phe Tyr Gln Lys Lys Gly Lys His	
85 90 95	
atc atc acc agc aaa acc gaa cac aaa gcg gta ctg gat acc tgc cgt	336
Ile Ile Thr Ser Lys Thr Glu His Lys Ala Val Leu Asp Thr Cys Arg	
100 105 110	
cag ctg gag cgc gaa ggt ttt gaa gtc acc tac ctg gca ccg cag cgt	384
Gln Leu Glu Arg Glu Gly Phe Glu Val Thr Tyr Leu Ala Pro Gln Arg	
115 120 125	
aac ggc att atc gac ctg aaa gaa ctt gaa gca gcg atg cgt gac gac	432
Asn Gly Ile Ile Asp Leu Lys Glu Leu Glu Ala Ala Met Arg Asp Asp	
130 135 140	
acc atc ctc gtg tcc atc atg cac gta aat aac gaa atc ggc gtg gtg	480
Thr Ile Leu Val Ser Ile Met His Val Asn Asn Glu Ile Gly Val Val	
145 150 155 160	
cag gat atc gcg gct atc ggc gaa atg tgc cgt gct cgt ggc att atc	528
Gln Asp Ile Ala Ala Ile Gly Glu Met Cys Arg Ala Arg Gly Ile Ile	
165 170 175	
tat cac gtt gat gca acc cag agc gtg ggt aaa ctg cct atc gac ctg	576
Tyr His Val Asp Ala Thr Gln Ser Val Gly Lys Leu Pro Ile Asp Leu	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

180	185	190	
agc cag ttg aaa gtt gac ctg atg tct ttc tcc ggt cac aaa atc tat			624
Ser Gln Leu Lys Val Asp Leu Met Ser Phe Ser Gly His Lys Ile Tyr			
195	200	205	
ggc ccg aaa ggt atc ggt gcg ctg tat gta cgt cgt aaa ccg cgc gta			672
Gly Pro Lys Gly Ile Gly Ala Leu Tyr Val Arg Arg Lys Pro Arg Val			
210	215	220	
cgc atc gaa gcg caa atg cac ggc ggc ggt cac gag cgc ggt atg cgt			720
Arg Ile Glu Ala Gln Met His Gly Gly Gly His Glu Arg Gly Met Arg			
225	230	235	240
tcc ggc act ctg cct gtt cac cag atc gtc gga atg ggc gag gcc tat			768
Ser Gly Thr Leu Pro Val His Gln Ile Val Gly Met Gly Glu Ala Tyr			
245	250	255	
cgc atc gca aaa gaa gag atg gcg acc gag atg gaa cgt ctg cgc ggc			816
Arg Ile Ala Lys Glu Glu Met Ala Thr Glu Met Glu Arg Leu Arg Gly			
260	265	270	
ctg cgt aac cgt ctg tgg aac ggc atc aaa gat atc gaa gaa gtt tac			864
Leu Arg Asn Arg Leu Trp Asn Gly Ile Lys Asp Ile Glu Glu Val Tyr			
275	280	285	
ctg aac ggt gac ctg gaa cac ggt gcg ccg aac att ctc aac gtc agc			912
Leu Asn Gly Asp Leu Glu His Gly Ala Pro Asn Ile Leu Asn Val Ser			
290	295	300	
ttc aac tac gtt gaa ggt gag tcg ctg att atg gcg ctg aaa gac ctc			960
Phe Asn Tyr Val Glu Gly Glu Ser Leu Ile Met Ala Leu Lys Asp Leu			
305	310	315	320
gca gtt tct tca ggt tcc gcc tgt acg tca gca agc ctc gaa ccg tcc			1008
Ala Val Ser Ser Gly Ser Ala Cys Thr Ser Ala Ser Leu Glu Pro Ser			
325	330	335	
tac gtg ctg cgc gcg ctg ggg ctg aac gac gag ctg gca cat agc tct			1056
Tyr Val Leu Arg Ala Leu Gly Leu Asn Asp Glu Leu Ala His Ser Ser			
340	345	350	
atc cgt ttc tct tta ggt cgt ttt act act gaa gaa gag atc gac tac			1104
Ile Arg Phe Ser Leu Gly Arg Phe Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp Tyr			
355	360	365	
acc atc gag tta gtt cgt aaa tcc atc ggt cgt ctg cgt gac ctt tct			1152
Thr Ile Glu Leu Val Arg Lys Ser Ile Gly Arg Leu Arg Asp Leu Ser			
370	375	380	
ccg ctg tgg gaa atg tac aag cag ggc gtg gat ctg aac agc atc gaa			1200

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11

Pro Leu Trp Glu Met Tyr Lys Gln Gly Val Asp Leu Asn Ser Ile Glu
 385 390 395 400

tgg gct cat cat taa 1215
 Trp Ala His His
 405

<210> 6
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 6
 Met Lys Leu Pro Ile Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala Thr Thr Pro Val Asp
 1 5 10 15

Pro Arg Val Ala Glu Lys Met Met Gln Phe Met Thr Met Asp Gly Thr
 20 25 30

Phe Gly Asn Pro Ala Ser Arg Ser His Arg Phe Gly Trp Gln Ala Glu
 35 40 45

Glu Ala Val Asp Ile Ala Arg Asn Gln Ile Ala Asp Leu Val Gly Ala
 50 55 60

Asp Pro Arg Glu Ile Val Phe Thr Ser Gly Ala Thr Glu Ser Asp Asn
 65 70 75 80

Leu Ala Ile Lys Gly Ala Ala Asn Phe Tyr Gln Lys Lys Gly Lys His
 85 90 95

Ile Ile Thr Ser Lys Thr Glu His Lys Ala Val Leu Asp Thr Cys Arg
 100 105 110

Gln Leu Glu Arg Glu Gly Phe Glu Val Thr Tyr Leu Ala Pro Gln Arg
 115 120 125

Asn Gly Ile Ile Asp Leu Lys Glu Leu Glu Ala Ala Met Arg Asp Asp
 130 135 140

Thr Ile Leu Val Ser Ile Met His Val Asn Asn Glu Ile Gly Val Val
 145 150 155 160

Gln Asp Ile Ala Ala Ile Gly Glu Met Cys Arg Ala Arg Gly Ile Ile
 165 170 175

Tyr His Val Asp Ala Thr Gln Ser Val Gly Lys Leu Pro Ile Asp Leu
 180 185 190

Ser Gln Leu Lys Val Asp Leu Met Ser Phe Ser Gly His Lys Ile Tyr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

195	200	205
Gly Pro Lys Gly Ile Gly Ala Leu Tyr Val Arg Arg Lys Pro Arg Val		
210	215	220
Arg Ile Glu Ala Gln Met His Gly Gly Gly His Glu Arg Gly Met Arg		
225	230	235 240
Ser Gly Thr Leu Pro Val His Gln Ile Val Gly Met Gly Glu Ala Tyr		
	245	250 255
Arg Ile Ala Lys Glu Glu Met Ala Thr Glu Met Glu Arg Leu Arg Gly		
	260	265 270
Leu Arg Asn Arg Leu Trp Asn Gly Ile Lys Asp Ile Glu Glu Val Tyr		
	275	280 285
Leu Asn Gly Asp Leu Glu His Gly Ala Pro Asn Ile Leu Asn Val Ser		
	290	295 300
Phe Asn Tyr Val Glu Gly Glu Ser Leu Ile Met Ala Leu Lys Asp Leu		
305	310	315 320
Ala Val Ser Ser Gly Ser Ala Cys Thr Ser Ala Ser Leu Glu Pro Ser		
	325	330 335
Tyr Val Leu Arg Ala Leu Gly Leu Asn Asp Glu Leu Ala His Ser Ser		
	340	345 350
Ile Arg Phe Ser Leu Gly Arg Phe Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp Tyr		
	355	360 365
Thr Ile Glu Leu Val Arg Lys Ser Ile Gly Arg Leu Arg Asp Leu Ser		
	370	375 380
Pro Leu Trp Glu Met Tyr Lys Gln Gly Val Asp Leu Asn Ser Ile Glu		
385	390	395 400
Trp Ala His His		

<210> 7

<211> 1221

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1221)

<400> 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13

atg att ttt tcc gtc gac aaa gtg cgg gcc gac ttt ccg gtg ctt tcg	48
Met Ile Phe Ser Val Asp Lys Val Arg Ala Asp Phe Pro Val Leu Ser	
1 5 10 15	
cggt gag gta aac ggt ttg ccg ctg gct tat ctc gac agc gcc gcc agt	96
Arg Glu Val Asn Gly Leu Pro Leu Ala Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Ser	
20 25 30	
gcg cag aaa ccg agc cag gtg att gac gcc gag gcc gag ttt tat cgt	144
Ala Gln Lys Pro Ser Gln Val Ile Asp Ala Glu Ala Glu Phe Tyr Arg	
35 40 45	
cat ggc tac gcg gcg gtg cat cgt ggt att cat acc tta agc gcc cag	192
His Gly Tyr Ala Ala Val His Arg Gly Ile His Thr Leu Ser Ala Gln	
50 55 60	
gcg acc gag aaa atg gag aac gtg cgc aag cgg gca tcg ctg ttt att	240
Ala Thr Glu Lys Met Glu Asn Val Arg Lys Arg Ala Ser Leu Phe Ile	
65 70 75 80	
aat gcc cgt tcg gcg gaa gag ctg gtg ttc gtc cgc ggc acg acg gaa	288
Asn Ala Arg Ser Ala Glu Glu Leu Val Phe Val Arg Gly Thr Thr Glu	
85 90 95	
ggg atc aat ctg gtc gcc aat agc tgg ggc aac agc aac gtg cgg gcg	336
Gly Ile Asn Leu Val Ala Asn Ser Trp Gly Asn Ser Asn Val Arg Ala	
100 105 110	
ggc gat aac atc atc atc agt cag atg gag cac cac gct aac att gtt	384
Gly Asp Asn Ile Ile Ile Ser Gln Met Glu His His Ala Asn Ile Val	
115 120 125	
ccc tgg cag atg ctt tgc gca cgc gtt ggc gca gag ctg cgt gtg atc	432
Pro Trp Gln Met Leu Cys Ala Arg Val Gly Ala Glu Leu Arg Val Ile	
130 135 140	
ccg ctc aat ccc gat ggt acg ttg caa ctg gag acg ctg cct acg ctg	480
Pro Leu Asn Pro Asp Gly Thr Leu Gln Leu Glu Thr Leu Pro Thr Leu	
145 150 155 160	
ttt gat gag aaa act cgc ctg ctg gca att act cat gtc tcc aac gtg	528
Phe Asp Glu Lys Thr Arg Leu Leu Ala Ile Thr His Val Ser Asn Val	
165 170 175	
ctt ggc aca gaa aat cca ctg gcg gaa atg atc acg ctt gcg cac cag	576
Leu Gly Thr Glu Asn Pro Leu Ala Glu Met Ile Thr Leu Ala His Gln	
180 185 190	
cat ggc gca aaa gtg ctg gtg gat ggc gct cag gcg gtg atg cat cat	624
His Gly Ala Lys Val Leu Val Asp Gly Ala Gln Ala Val Met His His	
195 200 205	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ccg gtg gat gtt cag gcg ctg gat tgc gac ttt tac gtg ttc tcc ggg	672
Pro Val Asp Val Gln Ala Leu Asp Cys Asp Phe Tyr Val Phe Ser Gly	
210 215 220	
cat aaa ctg tat ggc ccc acc gga att ggc att ctt tat gtg aaa gaa	720
His Lys Leu Tyr Gly Pro Thr Gly Ile Gly Ile Leu Tyr Val Lys Glu	
225 230 235 240	
gcc ttg ttg cag gag atg ccg ccg tgg gaa ggg ggc ggt tct atg atc	768
Ala Leu Leu Gln Glu Met Pro Pro Trp Glu Gly Gly Gly Ser Met Ile	
245 250 255	
gcc acc gtc agc ctg agt gaa ggc act acc tgg acc aaa gca cca tgg	816
Ala Thr Val Ser Leu Ser Glu Gly Thr Thr Trp Thr Lys Ala Pro Trp	
260 265 270	
cgg ttt gaa gcc ggt aca ccc aat acc ggg ggc atc att ggt ctt ggc	864
Arg Phe Glu Ala Gly Thr Pro Asn Thr Gly Gly Ile Ile Gly Leu Gly	
275 280 285	
gcg gcg ctg gag tat gtt tcg gcg ctg ggg ctt aat aac ata gcc gag	912
Ala Ala Leu Glu Tyr Val Ser Ala Leu Gly Leu Asn Asn Ile Ala Glu	
290 295 300	
tat gaa cag aat ctg atg cat tat gcg cta tca cag ctg gaa tct gta	960
Tyr Glu Gln Asn Leu Met His Tyr Ala Leu Ser Gln Leu Glu Ser Val	
305 310 315 320	
ccg gat ctc act ctc tat ggc cca caa aac agg ctt ggc gtt att gct	1008
Pro Asp Leu Thr Leu Tyr Gly Pro Gln Asn Arg Leu Gly Val Ile Ala	
325 330 335	
ttt aat ctc ggt aaa cac cac gcc tat gat gtt ggc agt ttt ctc gat	1056
Phe Asn Leu Gly Lys His His Ala Tyr Asp Val Gly Ser Phe Leu Asp	
340 345 350	
aat tac ggc att gct gtg cgt acc gga cat cac tgc gca atg cca ttg	1104
Asn Tyr Gly Ile Ala Val Arg Thr Gly His His Cys Ala Met Pro Leu	
355 360 365	
atg gcc tat tac aac gtc cct gcg atg tgt cgg gcg tcg ctg gcc atg	1152
Met Ala Tyr Tyr Asn Val Pro Ala Met Cys Arg Ala Ser Leu Ala Met	
370 375 380	
tat aac acc cat gaa gaa gtg gat cgt ctg gtg acc ggc ctg caa cgt	1200
Tyr Asn Thr His Glu Glu Val Asp Arg Leu Val Thr Gly Leu Gln Arg	
385 390 395 400	
att cac cgt ttg ctg gga taa	1221
Ile His Arg Leu Leu Gly	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

405

<210> 8

<211> 406

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 8

Met Ile Phe Ser Val Asp Lys Val Arg Ala Asp Phe Pro Val Leu Ser
 1 5 10 15

Arg Glu Val Asn Gly Leu Pro Leu Ala Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Ser
 20 25 30

Ala Gln Lys Pro Ser Gln Val Ile Asp Ala Glu Ala Glu Phe Tyr Arg
 35 40 45

His Gly Tyr Ala Ala Val His Arg Gly Ile His Thr Leu Ser Ala Gln
 50 55 60

Ala Thr Glu Lys Met Glu Asn Val Arg Lys Arg Ala Ser Leu Phe Ile
 65 70 75 80

Asn Ala Arg Ser Ala Glu Glu Leu Val Phe Val Arg Gly Thr Thr Glu
 85 90 95

Gly Ile Asn Leu Val Ala Asn Ser Trp Gly Asn Ser Asn Val Arg Ala
 100 105 110

Gly Asp Asn Ile Ile Ile Ser Gln Met Glu His His Ala Asn Ile Val
 115 120 125

Pro Trp Gln Met Leu Cys Ala Arg Val Gly Ala Glu Leu Arg Val Ile
 130 135 140

Pro Leu Asn Pro Asp Gly Thr Leu Gln Leu Glu Thr Leu Pro Thr Leu
 145 150 155 160

Phe Asp Glu Lys Thr Arg Leu Leu Ala Ile Thr His Val Ser Asn Val
 165 170 175

Leu Gly Thr Glu Asn Pro Leu Ala Glu Met Ile Thr Leu Ala His Gln
 180 185 190

His Gly Ala Lys Val Leu Val Asp Gly Ala Gln Ala Val Met His His
 195 200 205

Pro Val Asp Val Gln Ala Leu Asp Cys Asp Phe Tyr Val Phe Ser Gly
 210 215 220

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16

His Lys Leu Tyr Gly Pro Thr Gly Ile Gly Ile Leu Tyr Val Lys Glu
 225 230 235 240
 Ala Leu Leu Gln Glu Met Pro Pro Trp Glu Gly Gly Gly Ser Met Ile
 245 250 255
 Ala Thr Val Ser Leu Ser Glu Gly Thr Thr Trp Thr Lys Ala Pro Trp
 260 265 270
 Arg Phe Glu Ala Gly Thr Pro Asn Thr Gly Gly Ile Ile Gly Leu Gly
 275 280 285
 Ala Ala Leu Glu Tyr Val Ser Ala Leu Gly Leu Asn Asn Ile Ala Glu
 290 295 300
 Tyr Glu Gln Asn Leu Met His Tyr Ala Leu Ser Gln Leu Glu Ser Val
 305 310 315 320
 Pro Asp Leu Thr Leu Tyr Gly Pro Gln Asn Arg Leu Gly Val Ile Ala
 325 330 335
 Phe Asn Leu Gly Lys His His Ala Tyr Asp Val Gly Ser Phe Leu Asp
 340 345 350
 Asn Tyr Gly Ile Ala Val Arg Thr Gly His His Cys Ala Met Pro Leu
 355 360 365
 Met Ala Tyr Tyr Asn Val Pro Ala Met Cys Arg Ala Ser Leu Ala Met
 370 375 380
 Tyr Asn Thr His Glu Glu Val Asp Arg Leu Val Thr Gly Leu Gln Arg
 385 390 395 400
 Ile His Arg Leu Leu Gly
 405

<210> 9

<211> 3720

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (530)..(1684)

<400> 9

gacgtctgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac agggccctcg gacaccgagg 60

agaatgtcaa gaggcgaaca cacaacgtct tggagcgcca gaggaggaac gagctaaaac 120

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ggagcttttt tgccctgcgt gaccagatcc cggagttgga aaacaatgaa aaggccccc 180
 aggtagttat ccttaaaaaa gccacagcat acatcctgtc cgtccaagca gaggagcaaa 240
 agctcatttc tgaagaggac ttgttgcgga aacgacgaga acagttgaaa cacaaacttg 300
 aacagctacg gaactcttgt gcgtaaggaa aagtaaggaa aacgattcct tctaacagaa 360
 atgtcctgag caatcaccta tgaactgtcg actcgagata gcatttttat ccataagatt 420
 agccgatcct aaggttttaca attgtgagcg ctcaacaatta tgatagattc aattgtgagc 480
 ggataacaat ttcacacacg ctacggttac caaagaggag aaattaact atg gca aaa 538
 Met Ala Lys
 1

cac ctt ttt acg tcc gag tcc gtc tct gaa ggg cat cct gac aaa att 586
 His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro Asp Lys Ile
 5 10 15

gct gac caa att tct gat gcc gtt tta gac gcg atc ctc gaa cag gat 634
 Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu Glu Gln Asp
 20 25 30 35

ccg aaa gca cgc gtt gct tgc gaa acc tac gta aaa acc ggc atg gtt 682
 Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr Gly Met Val
 40 45 50

tta gtt ggc ggc gaa atc acc acc agc gcc tgg gta gac atc gaa gag 730
 Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp Ile Glu Glu
 55 60 65

atc acc cgt aac acc gtt cgc gaa att ggc tat gtg cat tcc gac atg 778
 Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His Ser Asp Met
 70 75 80

ggc ttt gac gct aac tcc tgt gcg gtt ctg agc gct atc ggc aaa cag 826
 Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile Gly Lys Gln
 85 90 95

tct cct gac atc aac cag ggc gtt gac cgt gcc gat ccg ctg gaa cag 874
 Ser Pro Asp Ile Asn Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp Pro Leu Glu Gln
 100 105 110 115

ggc gcg ggt gac cag ggt ctg atg ttt ggc tac gca act aat gaa acc 922
 Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asn Glu Thr
 120 125 130

gac gtg ctg atg cca gca cct atc acc tat gca cac cgt ctg gta cag 970
 Asp Val Leu Met Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His Arg Leu Val Gln
 135 140 145

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cgt cag gct gaa gtg cgt aaa aac ggc act ctg ccg tgg ctg cgc ccg	1018
Arg Gln Ala Glu Val Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro Trp Leu Arg Pro	
150 155 160	
gac gcg aaa agc cag gtg act ttt cag tat gac gac ggc aaa atc gtt	1066
Asp Ala Lys Ser Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp Asp Gly Lys Ile Val	
165 170 175	
ggt atc gat gct gtc gtg ctt tcc act cag cac tct gaa gag atc gac	1114
Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu Glu Ile Asp	
180 185 190 195	
cag aaa tcg ctg caa gaa gcg gta atg gaa gag atc atc aag cca att	1162
Gln Lys Ser Leu Gln Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile Lys Pro Ile	
200 205 210	
ctg ccc gct gaa tgg ctg act tct gcc acc aaa ttc ttc atc aac ccg	1210
Leu Pro Ala Glu Trp Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe Phe Ile Asn Pro	
215 220 225	
acc ggt cgt ttc gtt atc ggt ggc cca atg ggt gac tgc ggt ctg act	1258
Thr Gly Arg Phe Val Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys Gly Leu Thr	
230 235 240	
ggt cgt aaa att atc gtt gat acc tac ggc ggc atg gcg cgt cac ggt	1306
Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala Arg His Gly	
245 250 255	
ggc ggt gca ttc tct ggt aaa gat cca tca aaa gtg gac cgt tcc gca	1354
Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val Asp Arg Ser Ala	
260 265 270 275	
gcc tac gca gca cgt tat gtc gcg aaa aac atc gtt gct gct ggc ctg	1402
Ala Tyr Ala Ala Arg Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala Ala Gly Leu	
280 285 290	
gcc gat cgt tgt gaa att cag gtt tcc tac gca atc ggc gtg gct gaa	1450
Ala Asp Arg Cys Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile Gly Val Ala Glu	
295 300 305	
ccg acc tcc atc atg gta gaa act ttc ggt act gag aaa gtg cct tct	1498
Pro Thr Ser Ile Met Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys Val Pro Ser	
310 315 320	
gaa caa ctg acc ctg ctg gta cgt gag ttc ttc gac ctg cgc cca tac	1546
Glu Gln Leu Thr Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe Asp Leu Arg Pro Tyr	
325 330 335	
ggt ctg att cag atg ctg gat ctg ctg cac ccg atc tac aaa gaa acc	1594
Gly Leu Ile Gln Met Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr Lys Glu Thr	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

340

345

350

355

gca gca tac ggt cac ttt ggt cgt gaa cat ttc ccg tgg gaa aaa acc 1642
 Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu His Phe Pro Trp Glu Lys Thr
 360 365 370

gac aaa gcg cag ctg ctg cgc gat gct gcc ggt ctg aag taa 1684
 Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys
 375 380 385

tcggtaccgc ttgatatcga attcctgcag cccgggggat cccatggtac gcgtgctaga 1744
 ggcatacaat aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttggt 1804
 tgtcggtgaa cgctctcctg agtaggacaa atccgcgcc ctagacctag gggatatatt 1864
 ccgcttcttc gctcactgac tcgctacgct cggctcgttcg actgcggcga gcggaaatgg 1924
 cttacgaacg gggcggagat ttcttggaag atgccaggaa gatacttaac aggggaagtga 1984
 gagggccgcg gcaaagccgt ttttccatag gctccgcccc cctgacaagc atcacgaaat 2044
 ctgacgctca aatcagtggg ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 2104
 ccctggcggc tccctcgtgc gctctcctgt tcttgccctt cggtttaccg gtgtcattcc 2164
 gctgttatgg ccgcgtttgt ctcatccac gcctgacact cagttccggg taggcagttc 2224
 gctccaagct ggactgtatg cacgaacccc ccgttcagtc cgaccgctgc gccttatccg 2284
 gtaactatcg tcttgagtcc aaccggaaa gacatgcaa agcaccactg gcagcagcca 2344
 ctggtaattg atttagagga gttagtcttg aagtcatgcg ccggttaagg ctaaactgaa 2404
 aggacaagtt ttggtgactg cgctcctcca agccagttac ctcggttcaa agagttggta 2464
 gctcagagaa ccttcgaaaa accgcctgc aaggcggttt tttcgttttc agagcaagag 2524
 attacgcgca gacaaaacg atctcaagaa gatcatctta ttaatcagat aaaatatttc 2584
 tagatttcag tgcaatttat ctcttcaaat gtagcacctg aagtcagccc catacgatat 2644
 aagttgttac tagtgcttgg attctcacca ataaaaaacg cccggcgcca accgagcgtt 2704
 ctgaacaaat ccagatggag ttctgaggtc attactggat ctatcaacag gagtccaage 2764
 gagctctcga accccagagt cccgctcaga agaactcgtc aagaaggcga tagaaggcga 2824
 tgcgctgcga atcgggagcg gcgataccgt aaagcacgag gaagcgggtca gccatttcgc 2884
 cgccaagctc ttcagcaata tcacgggtag ccaacgctat gtctgatag cggctccgcca 2944

THIS PAGE BLANK (USPTO)

caccagccg gccacagtcg atgaatccag aaaagcggcc attttccacc atgatattcg 3004
 gcaagcaggc atcgccatgg gtcacgacga gatcctcgcc gtcgggcatg cgcgccttga 3064
 gcctggcgaa cagttcggct ggcgcgagcc cctgatgctc ttcgtccaga tcctcctgat 3124
 cgacaagacc ggcttccatc cgagtacgtg ctcgctcgat gcgatgtttc gcttggtggt 3184
 cgaatgggca ggtagccgga tcaagcgtat gcagccgccg cattgcatca gccatgatgg 3244
 atactttctc ggcaggagca aggtgagatg acaggagatc ctgccccggc acttcgcca 3304
 atagcagcca gtcccttccc gcttcagtga caacgtcgag cacagctgcg caaggaacgc 3364
 ccgtcgtggc cagccacgat agccgcgctg cctcgtcctg cagttcatc agggcaccgg 3424
 acaggtcggt cttgacaaaa agaaccgggc gccctcgcg tgacagccgg aacacggcgg 3484
 catcagagca gccgattgtc tgttgtgccc agtcatagcc gaatagcctc tccacccaag 3544
 cggccggaga acctgcgtgc aatccatctt gttcaatcat gcgaaacgat cctcatcctg 3604
 tctcttgatc agatcttgat ccctgcgcc atcagatcct tggcggcaag aaagccatcc 3664
 agtttacttt gcagggcttc ccaaccttac cagagggcgc cccagctggc aattcc 3720

<210> 10

<211> 384

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 10

Met Ala Lys His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro

1

5

10

15

Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu

20

25

30

Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr

35

40

45

Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp

50

55

60

Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His

65

70

75

80

Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile

85

90

95

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gly	Lys	Gln	Ser	Pro	Asp	Ile	Asn	Gln	Gly	Val	Asp	Arg	Ala	Asp	Pro	100	105	110	
Leu	Glu	Gln	Gly	Ala	Gly	Asp	Gln	Gly	Leu	Met	Phe	Gly	Tyr	Ala	Thr	115	120	125	
Asn	Glu	Thr	Asp	Val	Leu	Met	Pro	Ala	Pro	Ile	Thr	Tyr	Ala	His	Arg	130	135	140	
Leu	Val	Gln	Arg	Gln	Ala	Glu	Val	Arg	Lys	Asn	Gly	Thr	Leu	Pro	Trp	145	150	155	160
Leu	Arg	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Gln	Val	Thr	Phe	Gln	Tyr	Asp	Asp	Gly	165	170	175	
Lys	Ile	Val	Gly	Ile	Asp	Ala	Val	Val	Leu	Ser	Thr	Gln	His	Ser	Glu	180	185	190	
Glu	Ile	Asp	Gln	Lys	Ser	Leu	Gln	Glu	Ala	Val	Met	Glu	Glu	Ile	Ile	195	200	205	
Lys	Pro	Ile	Leu	Pro	Ala	Glu	Trp	Leu	Thr	Ser	Ala	Thr	Lys	Phe	Phe	210	215	220	
Ile	Asn	Pro	Thr	Gly	Arg	Phe	Val	Ile	Gly	Gly	Pro	Met	Gly	Asp	Cys	225	230	235	240
Gly	Leu	Thr	Gly	Arg	Lys	Ile	Ile	Val	Asp	Thr	Tyr	Gly	Gly	Met	Ala	245	250	255	
Arg	His	Gly	Gly	Gly	Ala	Phe	Ser	Gly	Lys	Asp	Pro	Ser	Lys	Val	Asp	260	265	270	
Arg	Ser	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Arg	Tyr	Val	Ala	Lys	Asn	Ile	Val	Ala	275	280	285	
Ala	Gly	Leu	Ala	Asp	Arg	Cys	Glu	Ile	Gln	Val	Ser	Tyr	Ala	Ile	Gly	290	295	300	
Val	Ala	Glu	Pro	Thr	Ser	Ile	Met	Val	Glu	Thr	Phe	Gly	Thr	Glu	Lys	305	310	315	320
Val	Pro	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Leu	Leu	Val	Arg	Glu	Phe	Phe	Asp	Leu	325	330	335	
Arg	Pro	Tyr	Gly	Leu	Ile	Gln	Met	Leu	Asp	Leu	Leu	His	Pro	Ile	Tyr	340	345	350	
Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Tyr	Gly	His	Phe	Gly	Arg	Glu	His	Phe	Pro	Trp	355	360	365	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys
 370 375 380

<210> 11

<211> 3794

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (601)..(1806)

<400> 11

gacgtctgtg tgggaattgtg agcggataac aatttcacac agggccctcg gacaccgagg 60
 agaatgtcaa gaggcgaaca cacaacgtct tggagcgcca gaggaggaac gagctaaaac 120
 ggagcttttt tgccttgcgt gaccagatcc cggagttgga aaacaatgaa aaggccccc 180
 aggtagttat ccttaaaaaa gccacagcat acatcctgtc cgtccaagca gaggagcaaa 240
 agctcatttc tgaagaggac ttgttgcgga aacgacgaga acagttgaaa cacaaacttg 300
 aacagctacg gaactcttgt gcgtaaggaa aagtaaggaa aacgattcct tctaacagaa 360
 atgtcctgag caatcaccta tgaactgtcg actcgagata gcatttttat ccataagatt 420
 agccgatcct aaggtttaca attgtgagcg ctcacaatta tgatagattc aattgtgagc 480
 ggataacaat ttcacacacg ctacgggtac cgggcccccc ctcgagggtcg acggtatcga 540
 taagcttgat atcgaattcc tgcagcccgg gggatcccat ggtacgcgtc gaggagtacc 600
 atg aac gtt ttt aat ccc gcg cag ttt cgc gcc cag ttt ccc gca cta 648
 Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 cag gat gcg ggc gtc tat ctc gac agc gcc gcg acc gcg ctt aaa cct 696
 Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro
 20 25 30
 gaa gcc gtg gtt gaa gcc acc caa cag ttt tac agt ctg agc gcc gga 744
 Glu Ala Val Val Glu Ala Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly
 35 40 45
 aac gtc cat cgc agc cag ttt gcc gaa gcc caa cgc ctg acc gcg cgt 792
 Asn Val His Arg Ser Gln Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg
 50 55 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tat gaa gct gca cga gag aaa gtg gcg caa tta ctg aat gca ccg gat	840
Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp	
65 70 75 80	
gat aaa act atc gtc tgg acg cgc ggc acc act gaa tcc atc aac atg	888
Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met	
85 90 95	
gtg gca caa tgc tat gcg cgt ccg cgt ctg caa ccg ggc gat gag att	936
Val Ala Gln Cys Tyr Ala Arg Pro Arg Leu Gln Pro Gly Asp Glu Ile	
100 105 110	
att gtc agc gtg gca gaa cac cac gcc aac ctc gtc ccc tgg ctg atg	984
Ile Val Ser Val Ala Glu His His Ala Asn Leu Val Pro Trp Leu Met	
115 120 125	
gtc gcc caa caa act gga gcc aaa gtg gtg aaa ttg ccg ctt aat gcg	1032
Val Ala Gln Gln Thr Gly Ala Lys Val Val Lys Leu Pro Leu Asn Ala	
130 135 140	
cag cga ctg ccg gat gtc gat ttg ttg cca gaa ctg att act ccc cgt	1080
Gln Arg Leu Pro Asp Val Asp Leu Leu Pro Glu Leu Ile Thr Pro Arg	
145 150 155 160	
agt cgg att ctg gcg ttg ggt cag atg tcg aac gtt act ggc ggt tgc	1128
Ser Arg Ile Leu Ala Leu Gly Gln Met Ser Asn Val Thr Gly Gly Cys	
165 170 175	
ccg gat ctg gcg cga gcg att acc ttt gct cat tca gcc ggg atg gtg	1176
Pro Asp Leu Ala Arg Ala Ile Thr Phe Ala His Ser Ala Gly Met Val	
180 185 190	
gtg atg gtt gat ggt gct cag ggg gca gtg cat ttc ccc gcg gat gtt	1224
Val Met Val Asp Gly Ala Gln Gly Ala Val His Phe Pro Ala Asp Val	
195 200 205	
cag caa ctg gat att gat ttc tat gct ttt tca ggt cac aaa ctg tat	1272
Gln Gln Leu Asp Ile Asp Phe Tyr Ala Phe Ser Gly His Lys Leu Tyr	
210 215 220	
ggc ccg aca ggt atc ggc gtg ctg tat ggt aaa tca gaa ctg ctg gag	1320
Gly Pro Thr Gly Ile Gly Val Leu Tyr Gly Lys Ser Glu Leu Leu Glu	
225 230 235 240	
gcg atg tcg ccc tgg ctg ggc ggc ggc aaa atg gtt cac gaa gtg agt	1368
Ala Met Ser Pro Trp Leu Gly Gly Gly Lys Met Val His Glu Val Ser	
245 250 255	
ttt gac ggc ttc acg act caa tct gcg ccg tgg aaa ctg gaa gct gga	1416
Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu Glu Ala Gly	
260 265 270	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

acg cca aat gtc gct ggt gtc ata gga tta agc gcg gcg ctg gaa tgg 1464
 Thr Pro Asn Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala Leu Glu Trp
 275 280 285

ctg gca gat tac gat atc aac cag gcc gaa agc tgg agc cgt agc tta 1512
 Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser Arg Ser Leu
 290 295 300

gca acg ctg gcg gaa gat gcg ctg gcg aaa cgt ccc ggc ttt cgt tca 1560
 Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser
 305 310 315 320

ttc cgc tgc cag gat tcc agc ctg ctg gcc ttt gat ttt gct ggc gtt 1608
 Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val
 325 330 335

cat cat agc gat atg gtg acg ctg ctg gcg gag tac ggt att gcc ctg 1656
 His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu
 340 345 350

cgg gcc ggg cag cat tgc gct cag ccg cta ctg gca gaa tta ggc gta 1704
 Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val
 355 360 365

acc ggc aca ctg cgc gcc tct ttt gcg cca tat aat aca aag agt gat 1752
 Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp
 370 375 380

gtg gat gcg ctg gtg aat gcc gtt gac cgc gcg ctg gaa tta ttg gtg 1800
 Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val
 385 390 395 400

gat taa acgcgtgcta gaggcacaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg 1856
 Asp

gcctttcggtt ttatctgttg tttgtcggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccc 1916

ccctagacct aggggatata ttccgcttcc tcgctcactg actcgcctacg ctcggtcggtt 1976

cgactgcggc gagcggaaat ggcttacgaa cggggcggag atttcttgga agatgccagg 2036

aagatactta acaggggaagt gagagggccg cggcaaagcc gtttttccat aggctccgcc 2096

ccctgacaa gcatcacgaa atctgacgt caaatcagtg gtggcgaaac ccgacaggac 2156

tataaagata ccaggcggtt cccctggcg gctccctcgt gcgctctcct gttcctgcct 2216

ttcggtttac cgggtgtcatt ccgctgttat ggccgcgttt gtctcattcc acgcctgaca 2276

ctcagttccg ggtaggcagt tcgctccaag ctggactgta tgcacgaacc ccccgttcag 2336

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tccgaccgct ggccttatac cggtaactat cgtcttgagt ccaacccgga aagacatgca 2396
aaagcaccac tggcagcagc cactggtaat tgatttagag gagttagtct tgaagtcacg 2456
cgccgggttaa ggctaaactg aaaggacaag ttttggtgac tgcgctcctc caagccagtt 2516
acctcggttc aaagagttgg tagctcagag aaccttcgaa aaaccgccct gcaaggcggt 2576
tttttcgttt tcagagcaag agattacgcg cagacaaaaa cgatctcaag aagatcatct 2636
tattaatcag ataaaatatt tctagatttc agtgcaattt atctcttcaa atgtagcacc 2696
tgaagtcagc cccatacgat ataagttggt actagtgcct ggattctcac caataaaaaa 2756
cgcccgggcg caaccgagcg ttctgaacaa atccagatgg agttctgagg tcattactgg 2816
atctatcaac aggagtccaa gcgagctctc gaaccccaga gtcccgtca gaagaactcg 2876
tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc gaatcgggag cggcgatacc gtaaagcacg 2936
aggaagcggt cagcccattc gccgccaagc tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgct 2996
atgtcctgat agcgggtccgc cacaccacgc cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg 3056
ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag gcatcgccat gggtcacgac gagatcctcg 3116
ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg aacagttcgg ctggcgcgag cccctgatgc 3176
tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga ccggcttcca tccgagtacg tgctcgctcg 3236
atgcgatgtt tcgcttggtg gtcgaatggg caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc 3296
cgcattgcat cagccatgat ggatactttc tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga 3356
tctgccccg gcacttcgcc caatagcagc cagtcccttc ccgcttcagt gacaacgctg 3416
agcacagctg cgcaaggaac gcccgtcgtg gccagccacg atagccgcgc tgcctcgtcc 3476
tgcagttcat tcagggcacc ggacaggtcg gtcttgacaa aaagaaccgg gcgccccctgc 3536
gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag cagccgattg tctgttggtc ccagtcatag 3596
ccgaatagcc tctccacca agcggccgga gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc 3656

atgcgaaaag atcctcatcc tgtctcttga tcagatcttg atccccctgc ccatcagatc 3716
cttggcggca agaaagccat ccagtttact ttgcagggtc tcccaacctt accagagggc 3776
gccccagctg gcaattcc 3794

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 12

<211> 401

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 12

Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro
 20 25 30

Glu Ala Val Val Glu Ala Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly
 35 40 45

Asn Val His Arg Ser Gln Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg
 50 55 60

Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met
 85 90 95

Val Ala Gln Cys Tyr Ala Arg Pro Arg Leu Gln Pro Gly Asp Glu Ile
 100 105 110

Ile Val Ser Val Ala Glu His His Ala Asn Leu Val Pro Trp Leu Met
 115 120 125

Val Ala Gln Gln Thr Gly Ala Lys Val Val Lys Leu Pro Leu Asn Ala
 130 135 140

Gln Arg Leu Pro Asp Val Asp Leu Leu Pro Glu Leu Ile Thr Pro Arg
 145 150 155 160

Ser Arg Ile Leu Ala Leu Gly Gln Met Ser Asn Val Thr Gly Gly Cys
 165 170 175

Pro Asp Leu Ala Arg Ala Ile Thr Phe Ala His Ser Ala Gly Met Val
 180 185 190

Val Met Val Asp Gly Ala Gln Gly Ala Val His Phe Pro Ala Asp Val
 195 200 205

Gln Gln Leu Asp Ile Asp Phe Tyr Ala Phe Ser Gly His Lys Leu Tyr
 210 215 220

Gly Pro Thr Gly Ile Gly Val Leu Tyr Gly Lys Ser Glu Leu Leu Glu
 225 230 235 240

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ala Met Ser Pro Trp Leu Gly Gly Gly Lys Met Val His Glu Val Ser
245 250 255

Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu Glu Ala Gly
260 265 270

Thr Pro Asn Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala Leu Glu Trp
275 280 285

Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser Arg Ser Leu
290 295 300

Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser
305 310 315 320

Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val
325 330 335

His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu
340 345 350

Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val
355 360 365

Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp
370 375 380

Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val
385 390 395 400

Asp

<210> 13

<211> 4975

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (530)..(1684)

<220>

<221> CDS

<222> (1782)..(2987)

<400> 13

gacgtctgtg tgggaattgtg agcggataac aatttcacac agggccctcg gacaccgagg 60

agaatgtcaa gaggcgaaca cacaacgtct tggagcgcca gaggaggaac gagctaaaac 120

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ggagcttttt tgccctgcgt gaccagatcc cggagttgga aaacaatgaa aaggccccc 180
 aggtagttat ccttaaaaaa gccacagcat acatcctgtc cgtccaagca gaggagcaaa 240
 agctcatttc tgaagaggac ttgttgcgga aacgacgaga acagttgaaa cacaaacttg 300
 aacagctacg gaactcttgt gcgtaaggaa aagtaaggaa aacgattcct tctaacagaa 360
 atgtcctgag caatcaccta tgaactgtcg actcgagata gcatttttat ccataagatt 420
 agccgatcct aagggtttaca attgtgagcg ctcacaatta tgatagattc aattgtgagc 480
 ggataacaat ttcacacacg ctagcgggtac caaagaggag aaattaact atg gca aaa 538
 Met Ala Lys

1

cac ctt ttt acg tcc gag tcc gtc tct gaa ggg cat cct gac aaa att 586
 His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro Asp Lys Ile
 5 10 15

gct gac caa att tct gat gcc gtt tta gac gcg atc ctc gaa cag gat 634
 Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu Glu Gln Asp
 20 25 30 35

ccg aaa gca cgc gtt gct tgc gaa acc tac gta aaa acc ggc atg gtt 682
 Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr Gly Met Val
 40 45 50

tta gtt ggc ggc gaa atc acc acc agc gcc tgg gta gac atc gaa gag 730
 Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp Ile Glu Glu
 55 60 65

atc acc cgt aac acc gtt cgc gaa att ggc tat gtg cat tcc gac atg 778
 Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His Ser Asp Met
 70 75 80

ggc ttt gac gct aac tcc tgt gcg gtt ctg agc gct atc ggc aaa cag 826
 Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile Gly Lys Gln
 85 90 95

tct cct gac atc aac cag ggc gtt gac cgt gcc gat ccg ctg gaa cag 874
 Ser Pro Asp Ile Asn Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp Pro Leu Glu Gln
 100 105 110 115

ggc gcg ggt gac cag ggt ctg atg ttt ggc tac gca act aat gaa acc 922
 Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asn Glu Thr
 120 125 130

gac gtg ctg atg cca gca cct atc acc tat gca cac cgt ctg gta cag 970
 Asp Val Leu Met Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His Arg Leu Val Gln

THIS PAGE BLANK (USPTO)

135					140					145										
cg	tg	ca	g	g	aa	gt	cg	aa	aa	gc	ac	ct	cg	cc	tg	ct	cg	cc	g	1018
Arg	Gln	Ala	Glu	Val	Arg	Lys	Asn	Gly	Thr	Leu	Pro	Trp	Leu	Arg	Pro					
150					155					160										
ga	cg	aa	ag	ca	gt	ac	tt	ca	ta	ga	ga	gc	aa	at	gt					1066
Asp	Ala	Lys	Ser	Gln	Val	Thr	Phe	Gln	Tyr	Asp	Asp	Gly	Lys	Ile	Val					
165					170					175										
gg	at	ga	gt	gc	gt	ct	tc	ac	ca	ca	tc	ga	ga	at	ga					1114
Gly	Ile	Asp	Ala	Val	Val	Leu	Ser	Thr	Gln	His	Ser	Glu	Glu	Ile	Asp					
180					185					190					195					
ca	aa	tc	ct	ca	ga	gc	gt	at	ga	ga	at	at	aa	cc	at					1162
Gln	Lys	Ser	Leu	Gln	Glu	Ala	Val	Met	Glu	Glu	Ile	Ile	Lys	Pro	Ile					
200					205					210										
ct	cc	gt	ga	tg	ct	ac	tc	gc	ac	aa	tc	tc	at	aa	cc	g				1210
Leu	Pro	Ala	Glu	Trp	Leu	Thr	Ser	Ala	Thr	Lys	Phe	Phe	Ile	Asn	Pro					
215					220					225										
ac	gg	cg	tc	gt	at	gg	gc	cc	at	gg	ga	tg	gg	ct	ac					1258
Thr	Gly	Arg	Phe	Val	Ile	Gly	Gly	Pro	Met	Gly	Asp	Cys	Gly	Leu	Thr					
230					235					240										
gg	cg	aa	at	at	gt	ga	ac	ta	gc	gc	at	gc	cg	ca	gg					1306
Gly	Arg	Lys	Ile	Ile	Val	Asp	Thr	Tyr	Gly	Gly	Met	Ala	Arg	His	Gly					
245					250					255										
gc	gg	ga	tc	tc	gg	aa	ga	cc	ta	aa	gt	ga	cg	tc	ga					1354
Gly	Gly	Ala	Phe	Ser	Gly	Lys	Asp	Pro	Ser	Lys	Val	Asp	Arg	Ser	Ala					
260					265					270					275					
gc	ta	ga	ga	cg	ta	gt	gc	aa	aa	at	gt	gt	gt	gc	ct					1402
Ala	Tyr	Ala	Ala	Arg	Tyr	Val	Ala	Lys	Asn	Ile	Val	Ala	Ala	Gly	Leu					
280					285					290										
gc	ga	cg	tg	ga	at	ca	gt	tc	ta	ga	at	gc	gt	gt	ga					1450
Ala	Asp	Arg	Cys	Glu	Ile	Gln	Val	Ser	Tyr	Ala	Ile	Gly	Val	Ala	Glu					
295					300					305										
cc	ac	tc	at	at	gt	ga	ac	tc	gg	ac	ga	aa	gt	cc	tc					1498
Pro	Thr	Ser	Ile	Met	Val	Glu	Thr	Phe	Gly	Thr	Glu	Lys	Val	Pro	Ser					
310					315					320										
ga	ca	ct	ac	ct	ct	gt	ga	tc	tc	ga	ct	cg	cc	ta						1546
Glu	Gln	Leu	Thr	Leu	Leu	Val	Arg	Glu	Phe	Phe	Asp	Leu	Arg	Pro	Tyr					
325					330					335										
gg	ct	at	ca	at	ct	ga	ct	ct	ca	cc	at	ta	aa	ga	ac					1594

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30

Gly Leu Ile Gln Met Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr Lys Glu Thr
 340 345 350 355

gca gca tac ggt cac ttt ggt cgt gaa cat ttc ccg tgg gaa aaa acc 1642
 Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu His Phe Pro Trp Glu Lys Thr
 360 365 370

gac aaa gcg cag ctg ctg cgc gat gct gcc ggt ctg aag taa 1684
 Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys
 375 380 385

tcggtaccgg gccccccctc gaggtcgacg gtatcgataa gcttgatata gaattcctgc 1744

agcccggggg atcccatggt acgcgctcgag gaggacc atg aac gtt ttt aat ccc 1799
 Met Asn Val Phe Asn Pro
 390

gcg cag ttt cgc gcc cag ttt ccc gca cta cag gat gcg ggc gtc tat 1847
 Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 395 400 405

ctc gac agc gcc gcg acc gcg ctt aaa cct gaa gcc gtg gtt gaa gcc 1895
 Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro Glu Ala Val Val Glu Ala
 410 415 420

acc caa cag ttt tac agt ctg agc gcc gga aac gtc cat cgc agc cag 1943
 Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly Asn Val His Arg Ser Gln
 425 430 435

ttt gcc gaa gcc caa cgc ctg acc gcg cgt tat gaa gct gca cga gag 1991
 Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg Tyr Glu Ala Ala Arg Glu
 440 445 450 455

aaa gtg gcg caa tta ctg aat gca ccg gat gat aaa act atc gtc tgg 2039
 Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp Asp Lys Thr Ile Val Trp
 460 465 470

acg cgc ggc acc act gaa tcc atc aac atg gtg gca caa tgc tat gcg 2087
 Thr Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met Val Ala Gln Cys Tyr Ala
 475 480 485

cgt ccg cgt ctg caa ccg ggc gat gag att att gtc agc gtg gca gaa 2135
 Arg Pro Arg Leu Gln Pro Gly Asp Glu Ile Ile Val Ser Val Ala Glu
 490 495 500

cac cac gcc aac ctc gtc ccc tgg ctg atg gtc gcc caa caa act gga 2183
 His His Ala Asn Leu Val Pro Trp Leu Met Val Ala Gln Gln Thr Gly
 505 510 515

gcc aaa gtg gtg aaa ttg ccg ctt aat gcg cag cga ctg ccg gat gtc 2231
 Ala Lys Val Val Lys Leu Pro Leu Asn Ala Gln Arg Leu Pro Asp Val

THIS PAGE BLANK (USPTO)

520	525	530	535	
gat ttg ttg cca gaa ctg att act ccc cgt agt cgg att ctg gcg ttg				2279
Asp Leu Leu Pro Glu Leu Ile Thr Pro Arg Ser Arg Ile Leu Ala Leu				
	540	545	550	
ggt cag atg tcg aac gtt act ggc ggt tgc ccg gat ctg gcg cga gcg				2327
Gly Gln Met Ser Asn Val Thr Gly Gly Cys Pro Asp Leu Ala Arg Ala				
	555	560	565	
att acc ttt gct cat tca gcc ggg atg gtg gtg atg gtt gat ggt gct				2375
Ile Thr Phe Ala His Ser Ala Gly Met Val Val Met Val Asp Gly Ala				
	570	575	580	
cag ggg gca gtg cat ttc ccc gcg gat gtt cag caa ctg gat att gat				2423
Gln Gly Ala Val His Phe Pro Ala Asp Val Gln Gln Leu Asp Ile Asp				
	585	590	595	
ttc tat gct ttt tca ggt cac aaa ctg tat ggc ccg aca ggt atc ggc				2471
Phe Tyr Ala Phe Ser Gly His Lys Leu Tyr Gly Pro Thr Gly Ile Gly				
600	605	610	615	
gtg ctg tat ggt aaa tca gaa ctg ctg gag gcg atg tcg ccc tgg ctg				2519
Val Leu Tyr Gly Lys Ser Glu Leu Leu Glu Ala Met Ser Pro Trp Leu				
	620	625	630	
ggc ggc ggc aaa atg gtt cac gaa gtg agt ttt gac ggc ttc acg act				2567
Gly Gly Gly Lys Met Val His Glu Val Ser Phe Asp Gly Phe Thr Thr				
	635	640	645	
caa tct gcg ccg tgg aaa ctg gaa gct gga acg cca aat gtc gct ggt				2615
Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu Glu Ala Gly Thr Pro Asn Val Ala Gly				
	650	655	660	
gtc ata gga tta agc gcg gcg ctg gaa tgg ctg gca gat tac gat atc				2663
Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Tyr Asp Ile				
	665	670	675	
aac cag gcc gaa agc tgg agc cgt agc tta gca acg ctg gcg gaa gat				2711
Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser Arg Ser Leu Ala Thr Leu Ala Glu Asp				
680	685	690	695	
gcg ctg gcg aaa cgt ccc ggc ttt cgt tca ttc cgc tgc cag gat tcc				2759
Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser Phe Arg Cys Gln Asp Ser				
	700	705	710	
agc ctg ctg gcc ttt gat ttt gct ggc gtt cat cat agc gat atg gtg				2807
Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val His His Ser Asp Met Val				
	715	720	725	
acg ctg ctg gcg gag tac ggt att gcc ctg cgg gcc ggg cag cat tgc				2855

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu Arg Ala Gly Gln His Cys
 730 735 740

gct cag ccg cta ctg gca gaa tta ggc gta acc ggc aca ctg cgc gcc 2903
 Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val Thr Gly Thr Leu Arg Ala
 745 750 755

tct ttt gcg cca tat aat aca aag agt gat gtg gat gcg ctg gtg aat 2951
 Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp Val Asp Ala Leu Val Asn
 760 765 770 775

gcc gtt gac cgc gcg ctg gaa tta ttg gtg gat taa acgcgtgcta 2997
 Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val Asp
 780 785

gaggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcggtt ttatctgttg 3057

tttgtcgggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccg ccctagacct aggggatata 3117

ttccgcttcc tcgctcactg actcgtctacg ctcggtcggtt cgactgcggc gagcggaat 3177

ggcttacgaa cggggcggag atttcctgga agatgccagg aagataactta acaggggaagt 3237

gagagggccg cggcaaagcc gtttttccat aggctccgcc cccctgacaa gcatcacgaa 3297

atctgacgct caaatcagtg gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 3357

ccccctggcg gctccctcgt gcgctctcct gttcctgcct ttcggtttac cgggtgtcatt 3417

ccgctgttat ggccgcggtt gtctcattcc acgcctgaca ctgagttccg ggtaggcagt 3477

tcgctccaag ctggactgta tgcacgaacc ccccgttcag tccgaccgct gcgccttatac 3537

cggtaactat cgtcttgagt ccaaccggga aagacatgca aaagcaccac tggcagcagc 3597

cactggtaat tgatttagag gagttagtct tgaagtcag cgccgggttaa ggctaaactg 3657

aaaggacaag ttttggtgac tgcgctcctc caagccagtt acctcggttc aaagagttgg 3717

tagctcagag aaccttcgaa aaaccgccct gcaaggcggt tttttcggtt tcagagcaag 3777

agattacgcg cagacccaaa cgatctcaag aagatcatct tattaatcag ataaaatatt 3837

tctagatttc agtgcaattt atctcttcaa atgtagcacc tgaagtcagc ccatacagat 3897

ataagttggtt actagtgtt ggattctcac caataaaaaa cgcccggcgg caaccgagcg 3957

ttctgaacaa atccagatgg agttctgagg tcattactgg atctatcaac aggagtccaa 4017

gcgagctctc gaaccccaga gtcccgtca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc 4077

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gatgcgctgc gaatcgggag cggcgatacc gtaaagcacg aggaagcggg cagcccatc 4137
 gccgccaagc tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat agcgggtccgc 4197
 cacacccagc cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt 4257
 cggcaagcag gcatcgccat gggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt 4317
 gagcctggcg aacagttcgg ctggcgcgag ccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg 4377
 atcgacaaga cgggcttcca tccgagtacg tgctcgctcg atgcgatgtt tcgcttggtg 4437
 gtcgaatggg caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat 4497
 ggatactttc tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tcttgccccg gcacttcgcc 4557
 caatagcagc cagtccttcc cgccttcagt gacaacgctg agcacagctg cgcaagggaac 4617
 gcccgctcgtg gccagccacg atagccgcgc tgctcgtcc tgcagttcat tcagggcacc 4677
 ggacaggctg gtcttgacaa aaagaaccgg gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc 4737
 ggcacagag cagccgattg tctgttggtg ccagtcatag ccgaatagcc tctccacca 4797
 agcggccgga gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atcctcatcc 4857
 tgtctcttga tcagatcttg atccccgcg ccatcagatc cttggcggca agaaagccat 4917
 ccagtttact ttgcagggct tcccaacctt accagagggc gcccagctg gcaattcc 4975

<210> 14

<211> 384

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 14

Met Ala Lys His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro
 1 5 10 15

Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu
 20 25 30

Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr
 35 40 45

Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp
 50 55 60

Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His
 65 70 75 80

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile
85 90 95

Gly Lys Gln Ser Pro Asp Ile Asn Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp Pro
100 105 110

Leu Glu Gln Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr
115 120 125

Asn Glu Thr Asp Val Leu Met Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His Arg
130 135 140

Leu Val Gln Arg Gln Ala Glu Val Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro Trp
145 150 155 160

Leu Arg Pro Asp Ala Lys Ser Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp Asp Gly
165 170 175

Lys Ile Val Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu
180 185 190

Glu Ile Asp Gln Lys Ser Leu Gln Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile
195 200 205

Lys Pro Ile Leu Pro Ala Glu Trp Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe Phe
210 215 220

Ile Asn Pro Thr Gly Arg Phe Val Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys
225 230 235 240

Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala
245 250 255

Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val Asp
260 265 270

Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala
275 280 285

Ala Gly Leu Ala Asp Arg Cys Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile Gly
290 295 300

Val Ala Glu Pro Thr Ser Ile Met Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys
305 310 315 320

Val Pro Ser Glu Gln Leu Thr Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe Asp Leu
325 330 335

Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Gln Met Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr
340 345 350

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Lys Glu Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu His Phe Pro Trp
 355 360 365

Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys
 370 375 380

<210> 15

<211> 401

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 15

Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro
 20 25 30

Glu Ala Val Val Glu Ala Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly
 35 40 45

Asn Val His Arg Ser Gln Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg
 50 55 60

Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met
 85 90 95

Val Ala Gln Cys Tyr Ala Arg Pro Arg Leu Gln Pro Gly Asp Glu Ile
 100 105 110

Ile Val Ser Val Ala Glu His His Ala Asn Leu Val Pro Trp Leu Met
 115 120 125

Val Ala Gln Gln Thr Gly Ala Lys Val Val Lys Leu Pro Leu Asn Ala
 130 135 140

Gln Arg Leu Pro Asp Val Asp Leu Leu Pro Glu Leu Ile Thr Pro Arg
 145 150 155 160

~~Ser Arg Ile Leu Ala Leu Gly Gln Met Ser Asn Val Thr Gly Gly Cys~~
 165 170 175

Pro Asp Leu Ala Arg Ala Ile Thr Phe Ala His Ser Ala Gly Met Val
 180 185 190

Val Met Val Asp Gly Ala Gln Gly Ala Val His Phe Pro Ala Asp Val

THIS PAGE BLANK (USPTO)

195					200					205					
Gln	Gln	Leu	Asp	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ala	Phe	Ser	Gly	His	Lys	Leu	Tyr
210						215						220			
Gly	Pro	Thr	Gly	Ile	Gly	Val	Leu	Tyr	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Glu
225				230						235				240	
Ala	Met	Ser	Pro	Trp	Leu	Gly	Gly	Gly	Lys	Met	Val	His	Glu	Val	Ser
				245						250				255	
Phe	Asp	Gly	Phe	Thr	Thr	Gln	Ser	Ala	Pro	Trp	Lys	Leu	Glu	Ala	Gly
		260						265						270	
Thr	Pro	Asn	Val	Ala	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Glu	Trp
275						280						285			
Leu	Ala	Asp	Tyr	Asp	Ile	Asn	Gln	Ala	Glu	Ser	Trp	Ser	Arg	Ser	Leu
290						295				300					
Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	Leu	Ala	Lys	Arg	Pro	Gly	Phe	Arg	Ser
305				310						315				320	
Phe	Arg	Cys	Gln	Asp	Ser	Ser	Leu	Leu	Ala	Phe	Asp	Phe	Ala	Gly	Val
				325				330						335	
His	His	Ser	Asp	Met	Val	Thr	Leu	Leu	Ala	Glu	Tyr	Gly	Ile	Ala	Leu
		340						345						350	
Arg	Ala	Gly	Gln	His	Cys	Ala	Gln	Pro	Leu	Leu	Ala	Glu	Leu	Gly	Val
355						360						365			
Thr	Gly	Thr	Leu	Arg	Ala	Ser	Phe	Ala	Pro	Tyr	Asn	Thr	Lys	Ser	Asp
370						375				380					
Val	Asp	Ala	Leu	Val	Asn	Ala	Val	Asp	Arg	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Val
385				390						395				400	
Asp															

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/01052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/54 C12P17/18 C12N9/10 C12N1/21 //(C12P17/18,
C12R1:19),(C12N1/21,C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 806 479 A (HOFFMANN LA ROCHE) 12 November 1997 (1997-11-12) abstract page 2, line 25 - line 37 examples 3,6,7,9 claim 3	1-14
Y	----- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 098, no. 001, 30 January 1998 (1998-01-30) & JP 09 224690 A (SHISEIDO CO LTD; TAKEDA CHEM IND LTD), 2 September 1997 (1997-09-02) abstract ----- -/-	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 July 1999

Date of mailing of the international search report

27/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/01052

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession Number H64925, 12 September 1997 (1997-09-12) BLATTNER F R ET AL: "hypothetical protein b1680 - Escherichia coli (strain K-12)" XP002109161 is identical to BIOS3</p>	13
A	<p>---</p>	1-12, 14
P, A	<p>WO 99 05285 A (SCHROEDER HARTWIG ; BASF AG (DE); HAUER BERNHARD (DE)) 4 February 1999 (1999-02-04) cited in the application the whole document</p>	1-14
A	<p>---</p> <p>DATABASE EMBL 'Online! Accession Number F65063, 12 September 1997 (1997-09-12) BLATTNER F R ET AL: "hypothetical protein b2810 - Escherichia coli (strain K-12)" XP002109162 is identical to BIOS1</p>	1-14
A	<p>---</p> <p>DATABASE SWISSPROT 'Online! Accession Number P39171, 1 February 1995 (1995-02-01) BLATTNER F R ET AL: "NIFS protein homolog" XP002109163 cited in the application is identical to BIOS2</p> <p>-----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/01052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0806479 A	12-11-1997	BR 9703055 A CN 1170762 A JP 10033189 A	29-09-1998 21-01-1998 10-02-1998
JP 09224690 A	02-09-1997	NONE	
WO 9905285 A	04-02-1999	DE 19731274 A	28-01-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 09 MAY 2000

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/048792	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/01052	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 17/02/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 19/02/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/54		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 10/08/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 02.05.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Halle. F Tel. Nr. +49 89 2399 8537 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlag des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-15 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-14 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/2-2/2 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-14
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt I, Paragraph 4, Zusätzliche Bemerkungen

Zu der Anmeldung gehört ein Sequenzprotokoll numeriert von Blatt 1 bis 36.

Zu Punkt V

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: EP-A-0 806 479

D2: PAJ vol. 098, no. 001, 30.01.1998

D3: Database EMBL, Accession Number H64925, 12.09.1997

D4: Database EMBL, Accession Number F65063, 12.09.1997

D5: Database SWISSPROT, Accession Number P39171, 01.02.1995

- 2.1 Laut Beschreibung (siehe Seite 4) lag der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein technisches, fermentatives Verfahren zur Herstellung von Biotin zu entwickeln, das eine möglichst hohe Biotinsynthese zeigt. Die Aufgabe wurde mittels einem Verfahren zur Herstellung von Biotin, gekennzeichnet durch die Expression und Synthese von Biotin in einem Wirtsorganismus aufgrund eines Genkonstrukts beinhaltend ein SAM (S-Adenosyl-Methionin)-Synthase-Gen in Kombination mit mindestens einem Biotin Biosynthesegen (bioS1, bioS2 oder bioS3) gelöst.
- 2.2 Im Hinblick auf den Stand der Technik wird der Gegenstand der Ansprüche 1-14 als neu betrachtet. Angesichts der gentechnischen Produktion von Biotin ist das SAM-Synthase-Gen aus D2 bekannt. Auch die bioS Genprodukte werden im Stand der Technik offenbart (bioS1, siehe D4; bioS2, s. D5; bioS3, s. D3), jedoch nicht im Zusammenhang mit der Produktion von Biotin (bezüglich des Dokuments WO-A- 99 05285, zitiert im internationalen Recherchenbericht als P,A-Dokument, siehe nachstehender Punkt VI). Somit ist die Kombination dieser bekannten Gene, wie sie im Genkonstrukt der vorliegenden Anmeldung beansprucht wird, nicht im Stand der Technik offenbart.
- 2.3 Im Hinblick auf den Stand der Technik beruht der Gegenstand der Ansprüche 1-14, in der vorliegenden Fassung, nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(a) Wie oben erwähnt (s. Absatz 2.2), sind im Stand der Technik die bioS Gene nicht im Zusammenhang mit der Produktion von Biotin beschrieben worden. Außerdem ist deren Kombination wie sie in der vorliegenden Anmeldung beansprucht wird, nicht bekannt. Da die bioS Proteinen, laut dem Stand der Technik, der Superfamilie der nifS Proteine zugewiesen werden (siehe z.B. Dokument D3), könnte die fermentative Produktion von Biotin mittels nifS Genprodukten (D1) als nächstliegender Stand der Technik bewertet werden. In diesem Dokument wird auf S-Adenosylmethionin hingewiesen, jedoch nicht auf das SAM-Synthase Gen. Dokument D2, hingegen, beschreibt die gentechnische Produktion von Biotin mittels einem rekombinanten Plasmid, das das SAM-Synthase Gen und das Biotin-Operon enthält. Da die bioS Gene nicht unmittelbar aus D1 und D2 abzuleiten sind, beruht der Gegenstand der Ansprüche 1-14, unserer Meinung nach, auf einer erfinderischen Tätigkeit, **insoweit als dieser Gegenstand nur durch die bioS Gene definiert wird und nicht durch deren funktionellen Varianten, Analogen oder Derivate.**

(b) Die funktionellen Varianten, Analoge oder Derivate umfassen unter anderem die bekannten nifS Gene (s. D1). Der Anmelder erwähnt diese Tatsache auf Seite 5 der Beschreibung (s. 2. Abschnitt). Die Kombination der nifS Gene aus D1 mit der SAM-Synthase aus D2 ist naheliegend für die Fachperson, auch wenn die nifS Gene in D1 aus Klebsiella pneumoniae (s. D1, Beispiel 2, S. 6) stammen und nicht aus E. coli, wo die bioS Gene abgeleitet worden sind (laut dem Stand der Technik D3, D4 und D5); den Hinweis zu dieser Kombination (D1-D2) bekommt die Fachperson über das Biotin-Operon, das im Stand der Technik (siehe z.B. EP-B-0 236 429 oder WO-A-94 08023, beide in der vorliegenden Anmeldung zitiert, s. S. 3, vorletzter Abschnitt) beschrieben wird. So werden, laut WO-A- 94 08023, die bereits klonierten Biotinsynthesegene (z.B. bioA und bioB des Biotin-Operons) in ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Biotin einbezogen. Das bioB Gen wird auch in D1 eingesetzt und zwar in Verbindung mit nifS. Jedoch wird das bioB Gen in der vorliegenden Erfindung erst ab Anspruch 5 eingesetzt. Trotzdem sind wir der Meinung, daß die Verbindung der Dokumente D1 und D2 über die oben genannten funktionellen Varianten nifS und die Biotin-Operon Gene (z.B. bioB) als naheliegend betrachtet werden kann. Somit beruht der Gegenstand der Ansprüche 1-14, in der vorliegenden Fassung, nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt VI

- 2.4 Es wird nach Regel 64.3 und 70.10 PCT auf die Anmeldung WO-A-99 05285 hingewiesen. Sie hat ein Veröffentlichungsdatum vom 04.02.1999, ein Anmeldedatum vom 02.07.1998 und ein beanspruchtes Prioritätsdatum vom 22.07.1997; sie gilt jedoch nicht als Stand der Technik für die internationale vorläufige Prüfung nach Artikel 33(2) und (3) im PCT-Verfahren. Diese Anmeldung offenbart die bioS1 und bioS2 Gene im Zusammenhang mit der gentechnischen Herstellung von Biotin.

Zu Punkt VIII

3. Die im Recherchenbericht genannten Dokumente D1-D4, aus denen sich der zugrundeliegende Stand der Technik ergibt, sind nicht in der Beschreibung angegeben (Regel 5.1(a)(ii) PCT).

m01-t84

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT FÜR DAS GEBIET DES PATENTWESENS

BM

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/048792	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 01052	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 17/02/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 19/02/1998
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C12N15/54 C12P17/18 C12N9/10 C12N1/21 //(C12P17/18,
 C12R1:19),(C12N1/21,C12R1:19)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 806 479 A (HOFFMANN LA ROCHE) 12. November 1997 (1997-11-12) Zusammenfassung Seite 2, Zeile 25 - Zeile 37 Beispiele 3,6,7,9 Anspruch 3	1-14
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 098, no. 001, 30. Januar 1998 (1998-01-30) & JP 09 224690 A (SHISEIDO CO LTD; TAKEDA CHEM IND LTD), 2. September 1997 (1997-09-02) Zusammenfassung	1-14



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Juli 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lejeune, R

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession Number H64925, 12. September 1997 (1997-09-12) BLATTNER F R ET AL: "hypothetical protein b1680 - Escherichia coli (strain K-12)" XP002109161 ist identisch zum BIOS3</p>	13
A	---	1-12, 14
P, A	<p>WO 99 05285 A (SCHROEDER HARTWIG ; BASF AG (DE); HAUER BERNHARD (DE)) 4. Februar 1999 (1999-02-04) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-14
A	---	
A	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession Number F65063, 12. September 1997 (1997-09-12) BLATTNER F R ET AL: "hypothetical protein b2810 - Escherichia coli (strain K-12)" XP002109162 ist identisch zum BIOS1</p>	1-14
A	---	
A	<p>DATABASE SWISSPROT 'Online! Accession Number P39171, 1. Februar 1995 (1995-02-01) BLATTNER F R ET AL: "NIFS protein homolog" XP002109163 in der Anmeldung erwähnt ist identisch zum BIOS2</p>	1-14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT
ENT COOPERATION TREA

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 21 October 1999 (21.10.99)	Applicant's or agent's file reference 0050/048792
International application No. PCT/EP99/01052	Priority date (day/month/year) 19 February 1998 (19.02.98)
International filing date (day/month/year) 17 February 1999 (17.02.99)	
Applicant SCHRÖDER, Hartwig	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
10 August 1999 (10.08.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Jean-Marie McAdams Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16X1

X

16526

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Translation
096 2 2419

Applicant's or agent's file reference 0050/048792	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/01052	International filing date (day/month/year) 17 February 1999 (17.02.99)	Priority date (day/month/year) 19 February 1998 (19.02.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/54		RECEIVED
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		JAN 11 2001 TECH CENTER 1600/2900

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 10 August 1999 (10.08.99)	Date of completion of this report 02 May 2000 (02.05.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

650701

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/01052

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☒ the international application as originally filed.

☐ the description, pages 1-15, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.

☐ the claims, Nos. 1-14, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.

☐ the drawings, sheets/fig 1/2-2/2, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/01052

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

...

4. The application includes a sequence protocol numbered from sheet 1 to sheet 36.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/01052

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-14	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The following documents are referred to:

D1: EP-A-0 806 479

D2: PAJ Vol. 098, N° 001, 30.01.1998

D3: Database EMBL, Accession N° H64925, 12.09.1997

D4: Database EMBL, Accession N° F65063, 12.09.1997D5: Database SWISSPROT, Accession N° P39171,
01.02.1995

2.1 The description indicates (on page 4) that the technical problem addressed by the present invention is that of developing a technical, fermentative method for producing biotin with a maximum level of biotin synthesis. That problem has been resolved by a biotin production method characterised by the expression and synthesis of biotin in a host organism based on a genetic recombination product containing a SAM (S-adenosyl-methionine) synthase gene in combination with at least one biotin biosynthesis gene (bioS1, bioS2 or bioS3).

2.2 The subject matter of Claims 1-14 is considered to be novel in relation to the prior art. In connection with the genetically engineered production of biotin, the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SAM synthase gene is known from D2. The bioS gene products are also disclosed in prior art (bioS1, see D4; bioS2, see D5; bioS3, see D3), though not in connection with the production of biotin (with regard to WO-A-99/05285, which is cited in the international search report as a document belonging to categories P and A, see Box VI, below). Thus, the combination of these known genes, as claimed in the genetic recombination product of the present application, is not disclosed in prior art.

- 2.3 The subject matter of **the present versions** of Claims 1-14 does not involve an inventive step in relation to the prior art:

(a) As mentioned above (cf. paragraph 2.2), the bioS genes are not described in connection with the production of biotin in the prior art documents. Furthermore, their combination as claimed in the present application is not known. Since the prior art indicates that bioS proteins are classed as belonging to the nifS protein superfamily (cf. D3, for example), the fermentative production of biotin using nifS gene products (D1) could be considered to represent the closest prior art. That document refers to S-adenosyl-methionine, but not to the SAM-synthase gene. However, D2 describes the genetically-engineered production of biotin using a recombination plasmid containing the SAM-synthase gene and the biotin operon. Since the bioS genes can not be inferred directly from D1 and D2, the examining authority considers that the subject matter of Claims 1-14 involves an inventive step, **insofar as it is defined only by the bioS genes, and not by functional variants, analogues or derivatives thereof.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(b) The functional variants, analogues or derivatives include the known *nifS* genes (cf. D1), *inter alia*. The applicants mention this fact on page 5 of the description (see 2nd paragraph). The combination of the *nifS* genes from D1 and the SAM-synthase from D2 is obvious to a person skilled in the art, even though the *nifS* genes in D1 come from Klebsiella pneumoniae (cf. D1, example 2, page 6) and not from E. coli, from which the *bioS* genes are derived (according to the prior art disclosed in D3, D4 and D5); a person skilled in the art would be prompted to consider this combination (D1-D2) by the biotin operon described in the prior art (cf., for example, EP-B-0 236 429 or WO-A-94/08023, both of which are cited in the present application: see page 3, penultimate paragraph). In WO-A-94/08023, the already cloned biotin synthesis genes (e.g. *bioA* and *bioB* of the biotin operon) are included in a biotechnological method for producing biotin. The *bioB* gene is also used in D1, in conjunction with *nifS*. However, in the present application, the *bioB* gene is not mentioned until Claim 5. The examining authority nevertheless believes that the combination of D1 and D2 using the above-mentioned *nifS* functional variants and the biotin operon genes (e.g. *bioB*) can be considered to be obvious. Consequently, the present versions of Claims 1-14 do not involve an inventive step.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of:

Box VI.2

- 2.4 WO-A-99/05285 is cited in connection with PCT Rules 64.3 and 70.10. This application has a publication date of 04.02.1999, a filing date of 02.07.1998 and a claimed priority date of 22.07.1997; however, in the PCT procedure it does not constitute prior art for the purpose of the international preliminary examination under PCT Article 33(2) and (3). This application discloses the bioS1 and bioS2 genes in connection with the genetically-engineered production of biotin.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/01052

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

3. Documents D1-D4, which are cited in the search report and which disclose the background art, are not mentioned in the description (PCT Rule 5.1(a)(ii)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)